

**ESTUDIO QUIMIOTAXONÓMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE CUATRO
ESPECIES DEL GÉNERO *Ficus* L. (Moraceae), PLANETA RICA (CÓRDOBA-
COLOMBIA).**

HÉCTOR JAVIER FURNIELES NÚÑEZ

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

2020



**ESTUDIO QUIMIOTAXONÓMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE CUATRO
ESPECIES DEL GÉNERO *Ficus* L. (Moraceae), PLANETA RICA (CÓRDOBA-
COLOMBIA).**

HÉCTOR JAVIER FURNIELES NÚÑEZ

Investigador Principal

DIRECTORES

JORGE ENRIQUE ARIAS, M.Sc.

Docente programa de Biología

Universidad de Córdoba

MARY CECILIA MONTAÑO, PhD.

Docente programa de Química

Universidad de Córdoba

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

*** FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS ***

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios, por brindarme sabiduría, fuerza y constancia para lograr culminar con éxito este importante objetivo en mi vida. A mi familia por su apoyo y confianza, a la tía universal Nadys Núñez Ortega, gracias por tanto.

A mis queridos padres Héctor Antonio Furnieles y Nerys Núñez Ortega, a mis hermanas Heidy Furnieles Núñez y Margarita Furnieles Núñez, por el apoyo incondicional y acompañamiento constante, aun en los momentos difíciles de esta hermosa travesía investigativa.

A la Doctora Mary Montaña y al Magister Jorge Arias, por asumir la dirección de este proyecto, infinitamente agradecido por sus orientaciones, por compartir sus importantes y valiosos conocimientos científicos, que permitieron en mí el crecimiento profesional y científico con pensamiento crítico en las ciencias exactas.

A los jurados, Doctora Rosalba Ruiz Vega y Magister Emmy Luz Sánchez, por sus valiosas recomendaciones.

A mis compañeros de estudio, mil gracias por su amistad, hermandad y compañerismo. Gracias por animarme a seguir en las dificultades. De cada uno guardo un hermoso recuerdo.

También quiero agradecer enormemente a mis compañeros de trabajo en el laboratorio de Productos Naturales, Rosaisela Pastrana, Julián Salas, Jamer Martínez, Yeiner Quiroz, José de la Ossa y todos los que laboran en esta área de aprendizaje, por su colaboración incondicional y los buenos momentos compartidos. De igual manera extendiendo mis más sinceros agradecimientos al Herbario de la Universidad de Córdoba, a sus integrantes Heidy Saab Ramos, Fray Galarcio y Julieth Mestra, por compartir sus valiosos conocimientos en taxonomía vegetal.

Finalmente agradezco a la Universidad de Córdoba, por abrirme sus puertas y brindarme todas las herramientas para lograr este objetivo, a la facultad de Ciencias Básicas y al maravilloso programa de Biología del cual hago parte, infinitas gracias a todos los docentes que me brindaron sus conocimientos, desde el primer semestre hasta el último. Gracias por transformar mi vida.

Una vez más me inclino a tus pies Dios, para agradecer cada minuto de vida y cada molécula de oxígeno que respiro, gracias por la sabiduría, por la fuerza, por el entendimiento; pero sobre todo por poner personas maravillosas en mi vida; mi familia, compañeros, amigos y docentes. La gloria siempre es para ti padre celestial.

CONTENIDO

1. CAPITULO 1. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES COMO CRITERIO QUIMIOTAXONÓMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO <i>Ficus</i> L. (MORACEAE).....	3
1.1. Introducción	4
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. General	5
1.2.2. Específicos	5
1.3. Estado de arte.....	6
1.3.1. Marco referencial	6
1.3.2. Marco teórico.....	7
1.3.2.1. Género <i>Ficus</i> L.....	8
➤ Distribución y Filogenia.....	8
➤ Biología reproductiva.....	10
➤ Divergencia y Diversificación.....	11
1.3.2.2. Fitoquímica del género.....	12
➤ Flavonoides	12
➤ Terpenos y/o esteroides	14
➤ Alcaloides.....	15
1.3.2.3. Quimiotaxonomía en plantas.....	15
➤ Origen biosintético de los Flavonoides	17
1.3.2.4. Técnicas de separación y análisis cromatográfico.	18
➤ Cromatografía de capa fina o capa delgada (CCF o CCD, por sus siglas en inglés) y Cromatografía en columna (CC).....	19
➤ Cromatografía de Gases (CG o GC, por sus siglas en inglés).....	20
➤ Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE o HPLC, por sus siglas en inglés).....	21
1.4. Materiales y método	23
1.4.1. Fase de campo.....	23
1.4.1.1. Área de estudio.....	23
1.4.1.2. Recolección del material biológico.	24

1.4.2.	Fase de laboratorio	25
1.4.2.1.	Preparación de los extractos etanólicos foliares.....	25
1.4.2.2.	Tamizaje fitoquímico preliminar.....	25
➤	Pruebas para alcaloides	26
➤	Pruebas para terpenos y/o esteroides.....	26
➤	Pruebas para Flavonoides.....	27
✓	<i>Reacción de la Cianidrina (HCl + Mg)</i>	27
✓	<i>Reacción con HCl concentrado.</i>	27
1.4.2.3.	Fraccionamiento de extractos etanólicos foliares por partición	27
1.4.2.4.	Fraccionamiento Cromatográfico (Cromatografía en columna)	28
1.5.	Resultados y discusión	29
1.5.1.	Obtención de los extractos etanólicos foliares	29
1.5.2.	Tamizaje fitoquímico.	29
1.5.3.	Obtención de subextractos acetato de etilo por partición.	33
1.6.	Conclusiones parciales.	38
1.7.	Recomendaciones.	38
2.	CAPITULO 2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO <i>Ficus</i> L. (MORACEAE) RECOLECTADAS EN PLANETA RICA, (CÓRDOBA-COLOMBIA).	
	39	
2.1.	Introducción	40
2.2.	Objetivos	42
2.2.1.	General.	42
2.2.2.	Específicos.	42
2.3.	Estado de arte	43
2.3.1.	Marco referencial.	43
2.3.2.	Marco teórico	45
2.3.2.1	Estrés oxidativo.....	45
2.3.2.2.	Actividad antioxidante.	46
2.3.2.3.	Sistema de defensa antioxidante.	49
➤	Sistema de defensa enzimático.....	50
➤	Sistema de defensa no enzimático.....	51

2.4.	Materiales y métodos.....	52
2.4.1.	Ensayos de actividad antioxidante.....	52
2.4.2.	Preparación y activación de los radicales DPPH. y ABTS⁺.....	52
2.4.3.	Determinación de la actividad antioxidante, métodos DPPH., ABTS⁺ y FRAP.	53
2.4.4.	Análisis estadístico.....	55
2.5.	Resultados y discusión.....	55
2.5.1.	Actividad antioxidante.....	55
2.5.2.	Análisis estadísticos.....	60
2.6.	Conclusión.....	62
2.7.	Recomendaciones.....	62
2.8.	BIBLIOGRAFÍA.....	63
2.9.	ANEXOS.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1 Distribución de la familia Moraceae.....	7
Figura 1.2 Distribución mundial de las secciones del género <i>Ficus</i> ,.....	9
Figura 1.3 Estructuras de flavonoides comunes en algunas plantas del género <i>Ficus</i>	13
Figura 1.4 Estructuras de los terpenos con núcleo estructural más común en algunas plantas del género <i>Ficus</i>	14
Figura 1.5 Estructuras de algunos alcaloides presentes en algunas plantas del género <i>Ficus</i>	15
Figura 1.6 Clasificación y estructura de flavonoides.	16
Figura 1.7 Ruta biosintéticas de los flavonoides.....	18
Figura 1.8 Representación de la separación de compuestos por cromatografía en capa delgada.	20
Figura 1.9 Representación de la separación de compuestos por cromatografía en columna.	20
Figura 1.10 Representación de la separación de compuestos por cromatografía de gases.	21
Figura 1.11 Representación de la separación de compuestos por HPLC.....	22
Figura 1.12 Ubicación de los puntos de muestreos en el área de estudio.	24
Figura 1.13 Procedimiento para el tamizaje fitoquímico.	26
Figura 1.14 Pruebas para flavonoides	30
Figura 1.15 Pruebas para alcaloides	31
Figura 1.16 Cromatoplasmas para terpenos y/o esteroides,.....	31
Figura 1.17 Cromatoplasmas de los subextractos acetato de etilo y extractos etanólicos foliares crudos	34
Figura 1.18 Monitoreo por CCD de la recolección de fracciones del subextracto AcOEt de <i>F. benjamina</i> , obtenidas por CC.	37
Figura 2.1 Efectos nocivos de los radicales libres	45
Figura 2.2 Gráfico de los porcentajes de inhibición (%Inh) versus las concentraciones de cada extracto etanólico foliar, por el método DPPH.	56
Figura 2.3 Gráfico de los porcentajes de inhibición (%Inh) versus las concentraciones de cada extracto etanólico foliar, por el método ABTS ⁺	57
Figura 2.4 Gráfico de absorbancia vs concentraciones de los extractos y la referencia (Ac gálico) en el ensayo FRAP.	58

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.1 Flavonoides descritos en algunas especies del género <i>Ficus</i>	13
Tabla 1.2 Terpenos y esteroides descritos en algunas especies del género <i>Ficus</i>	14
Tabla 1.3 Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo.	23
Tabla 1.4 Rendimiento y extracción de los extractos etanólicos foliares.	29
Tabla 1.5 Tamizaje fitoquímico para cada especie.	30
Tabla 1.6 Cantidad de subextracto obtenidos para cada especie.....	33
Tabla 1.7 Resumen de datos obtenidos por CCD de los subextractos AcOEt.	36
Tabla 2.1 Clasificación de los modelos de ensayo in vitro según su modo de reacción ET o HAT.	47
Tabla 2.2 Porcentaje de inhibición media (IC_{50}) método DPPH. y capacidad antioxidante expresada como equivalentes trolox (TEAC).	56
Tabla 2.3 Porcentaje de inhibición media (IC_{50}) método ABTS ⁺ y capacidad antioxidante expresada como equivalentes trolox (TEAC).	57
Tabla 2.4 Resultados del análisis de varianzas método DPPH.	61
Tabla 2.5 Resultados del análisis de varianzas método ABTS ⁺	61

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Cálculo del porcentaje de inhibición.	53
Ecuación 2 Conversión de unidades para los IC_{50} de los extractos, (mg/L) a (g/ml).	57
Ecuación 3 Cálculo de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC).	57
Ecuación 4 Conversión de unidades para los IC_{50} del Trolox, (mg/L) a (μ mol/ml).	57

ABREVIATURAS.

ABTS: Radical catiónico 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico).

AcOEt: Acetato de etilo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ANOVA: Análisis de varianzas.

BHA: Butilhidroxianisol.

BHT: Butilhidroxitolueno.

CC: Cromatografía en columna.

CCD: Cromatografía en capa delgada.

CE: Equivalentes de catequina.

CG: Cromatografía de gases.

CG-EM: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

DCM: Diclorometano.

DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo.

EM: Espectrometría de masas.

ERN: Especies reactivas de nitrógeno.

ERO: Especies reactivas de oxígeno.

ET: Transferencia de electrones.

EtOH: Etanol.

ETS: Espaciadores de transcritos externos.

FRAP: Potencial antioxidante de reducción férrica.

HAT: Transferencia de átomos de hidrógeno.

HCFP: Complejo ferrocianuro de potasio.

HCl: Ácido clorhídrico.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia.

HUC: Herbario Universidad de Córdoba.

IC₅₀: Porcentaje inhibitorio medio.

ITS: Espaciadores de transcritos internos.

LC: Cromatografía líquida.

MeOH: Metanol.

Mg: Magnesio.

mM: Unidad de medida Mili-molar.

Rf: Factor de retención.

RL: Radical libre.

S₂O₈K₂: Persulfato de potasio.

SODs: enzimas superóxido dismutasas.

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al Trolox.

TPTZ: Complejo tripiridiltriazina.

TROLOX: Ácido 6-hidroxí-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico.

μL: Microlitros.

Resumen

En la taxonomía de las plantas angiospermas, los caracteres florales generalmente han sido preferidos sobre los caracteres vegetativos, como se evidencia en muchos de los sistemas de clasificación, sin embargo, estos pueden variar significativamente, dificultando en algunos casos la identificación de especies vegetales. La quimiotaxonomía o quimiosistemática, evalúa la presencia de compuestos químicos en especies vegetales; el aspecto químico de la clasificación de las plantas, se basa en sus constituyentes, es decir, en sus características moleculares; estas, al igual que las características morfológicas, son controladas genéticamente, pero tienen la ventaja sobre las morfológicas, de poder ser descritas exactamente en términos de estructuras definidas y fórmulas químicas configuracionales. En este estudio se propuso determinar la presencia de compuestos fenólicos (Flavonoides) en los extractos etanólicos foliares de las especies *Ficus benjamina* L; *Ficus insípida* Willd; *Ficus elastica* Roxb. ex Hornem y *Ficus bullenei* I.M. Johnst, con el fin de aplicar el método comparativo de estructuras químicas y la relación taxonómica existente entre las especies investigadas, desde el punto de vista quimiotaxonómico.

Por otra parte, se evaluó la actividad antioxidante de los extractos etanólicos foliares de las especies *F. benjamina*, *F. insípida*, *F. elastica* y *F. bullenei*, empleando los métodos DPPH• (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil), ABTS⁺ (Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico)) y FRAP (Potencial Antioxidante de Reducción Férrica). Para ello se estableció un rango de concentraciones de trabajo entre 1 y 6 mg/L, para todos los extractos. Los valores de IC₅₀ determinados por el método DPPH• fueron de 5.4 mg/L, 4.8 mg/L, 2.4 mg/L y 3.9 mg/L, respectivamente. Para el método ABTS⁺, los valores IC₅₀ calculados fueron de 2.9 mg/L, 2.8mg/L, 3.7mg/L y 3.0 mg/L, para cada especie respectivamente. Para estos dos métodos se usó ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) como referencia. El método FRAP se trabajó con un rango de concentraciones entre 1 y 5 mg/L. Todos los extractos etanólicos foliares evaluados presentaron potencial de reducción férrica, siendo el más activo el extracto de la especie *Ficus elastica* y el de menor potencial frente al complejo TPTZ, fue el extracto EtOH foliar de la especie *F. bullenei*, comparado con la sustancia de referencia (Ácido gálico).

Palabras Clave: Quimiotaxonomía, Flavonoides, Género *Ficus*, Actividad antioxidante.

Abstract.

In the taxonomy of angiosperm plants, floral characters have generally been preferred over vegetative characters, as evidenced in many of the classification, systems; however, these can vary significantly, making it difficult in some cases to identify plant species. Chemotaxonomy or chemosystematics, evaluates the presence of chemical compounds in plant species; the chemical aspect of the classification of plants is based on their constituents, that is, on their molecular characteristics; These, like morphological characteristics, are genetically controlled, but have the advantage over morphological ones, of being able to be described exactly in terms of defined structures and configurational chemical formulas. In this study, it was proposed to determine the presence of phenolic compounds (Flavonoids) in the foliar ethanolic extracts of the *Ficus benjamina* L; *Ficus insipida* Willd; *Ficus elastica* Roxb ex Hornem and *Ficus bullenei* I.M. Johnst species, in order to apply the comparative method of chemical structures and the existing taxonomic relationship between the investigated species, from the chemotaxonomic point of view.

On the other hand, the antioxidant activity of the foliar ethanolic extracts of the species *F. benjamina*, *F. insipida*, *F. elastica* and *F. bullenei* was evaluated, using the methods DPPH. (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil), ABTS⁺⁺ (Acid 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulphonic)) and FRAP (Iron Reduction Antioxidant Potential). For this, a range of working concentrations between 1 and 6 mg / L was established for all extracts. The IC₅₀ values determined by the DPPH. method were 5.4 mg/L, 4.8 mg/L, 2.4 mg/L and 3.9 mg/L, respectively. For the ABTS⁺⁺ method, the IC₅₀ values calculated were 2.9 mg/L, 2.8mg/L, 3.7mg/L and 3.0 mg/L, for each species respectively. For these two methods 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Tolox) was used as a reference. The FRAP method was used with a concentration range between 1 and 5 mg/L. All the foliar ethanolic extracts evaluated presented iron reduction potential, the most active being the extract of the *Ficus elastica* species and the one with the lowest potential against the TPTZ complex, was the foliar EtOH extract of the *F. bullenei* species, compared to the substance of reference (Gallic acid).

Keywords: Chemotaxonomy, Flavonoids, Genus *Ficus*, Antioxidant Activity.

1. CAPITULO 1. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES COMO CRITERIO QUIMIOTAXONÓMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE CUATRO ESPECIES DEL GENERO *Ficus* L. (MORACEAE).

1.1. Introducción

La taxonomía es la disciplina científica que abarca la descripción, identificación, nomenclatura y clasificación de organismos, lo cual es fundamental para estudios biológicos (Peng, 2013). En las últimas décadas, el desarrollo de tecnologías moleculares y la introducción de la teoría filogenética, ha inducido a cambios revolucionarios en la taxonomía. En la era de la flora electrónica, la taxonomía clásica, que identifica taxones con base en la morfología, se ha convertido gradualmente en "Taxonomía integradora" (Dayrat, 2005), reuniendo evidencias de múltiples disciplinas, como por ejemplo, la filogenética molecular, biogeografía, anatomía comparada, ecología y química; con el fin de resolver problemas taxonómicos (Will *et al.*, 2005; Valdecasas *et al.*, 2008; Schlick-Steiner *et al.*, 2010; Padial *et al.*, 2010, como se citó en Xiang-Qin *et al.*, 2018).

Los sistemas naturales se basan esencialmente en estudios comparativos de características morfológicas y anatómicas, los cuales están indudablemente sujetos a control genético. Algunas de estas características son de naturaleza muy general y sirven para la separación en las grandes categorías sistemáticas, tales como: divisiones, clases y órdenes. Otras son menos generales y por lo tanto adecuadas para la delimitación de categorías más pequeñas: familias, géneros, subgéneros, etc. Al igual que los morfológicos, los caracteres químicos están determinados genéticamente y por consiguiente constituyen una valiosa fuente de información, no sólo para mejorar la clasificación de las especies, sino también para interpretar sus relaciones filogenéticas. El examen químico de plantas con perspectiva quimiotaxonómica comenzó a principios del siglo XX, donde el rápido avance durante la década de 1970, en el desarrollo de técnicas fitoquímicas como la cromatografía de gas capilar (o alta resolución), cromatografía líquida (LC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C (^1H ^{13}C NMR), abrió el camino para el desarrollo de esta línea de investigación. La distribución de metabolitos secundarios específicos es restringida a ciertos taxones, y esto conduce al desarrollo de la quimiotaxonómica. Se conoce que los metabolitos secundarios se biosintetizan en varios pasos, que involucran varias enzimas y, en consecuencia, activación y expresión genética (Sharma & Ramawat, 2013; Zhu *et al.*, 2014, como se cita en Ramawat, 2019).

Los compuestos fenólicos, alcaloides y terpenos, son los grupos de compuestos más importantes y utilizados en la clasificación quimiotaxonómica. Estos metabolitos secundarios muestran amplia

variación en la diversidad química, distribución y función. El sistema de clasificación quimiotaxonómica se basa en la similitud química de cada taxón (Rasool *et al.*, 2010 & Singh, 2016). De todos los compuestos secundarios, los flavonoides son los que más se han utilizado con fines taxonómicos, estos representan el grupo más grande de polifenoles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, pero con patrones o perfiles que tienden a ser especie-específicos, además, son sustancias cuya biosíntesis y acumulación son prácticamente independientes de influencias ambientales.

1.2. **Objetivos**

1.2.1. **General**

Evaluar como criterio quimiotaxonómico el contenido de flavonoides presente en los extractos etanólicos foliares de las especies *Ficus benjamina*, *Ficus insipida*, *Ficus elastica* y *Ficus bullenei*, recolectadas en Planeta Rica, Córdoba.

1.2.2. **Específicos**

- Realizar el análisis fitoquímico a los extractos etanólicos foliares de las especies *F. benjamina*, *F. insipida*, *F. elastica* y *F. bullenei*.
- Caracterizar químicamente los compuestos tipo flavonoides mayoritarios, presentes en los extractos etanólicos foliares de las especies *F. benjamina*, *F. insipida*, *F. elastica* y *F. bullenei*.
- Comparar los flavonoides caracterizados y proponerlos como criterio quimiotaxonómico.

1.3. Estado de arte

1.3.1. Marco referencial

Olaniran y colaboradores (2017), evaluaron las huellas químicas en seis especies del género *Ficus* L. (*Ficus exasperata*, *Ficus sycomorus*, *Ficus glumosa*, *Ficus mucosu*, *Ficus vogelli* y *Ficus cordata*) en Nigeria, basándose en los fitoconstituyentes para la clasificación taxonómica. Obtuvieron dos extractos foliares, uno etanólico y uno de cloroformo, estimando el contenido total de flavonoides, indicando que estos compuestos presentes en las especies son características genéticas, revelando información útil de la variación en los fitoconstituyentes, clave para identificar y clasificar algunas especies del género *Ficus* L, quimiotaxonómicamente.

Wang y colaboradores (2014), en China, identificaron en los tallos de *Ficus tsiangii* Merr. Ex Corner, 34 compuestos, incluidos 13 flavonoides, de los cuales cinco no se habían publicado para especies del género *Ficus* L, concluyendo que los flavonoides identificados podrían desempeñarse como importantes marcadores quimiotaxonómicos para diferenciar *Ficus tsiangii* de otras especies del género.

Greenham y colaboradores (2007), analizaron las hojas de 14 especies de *Ficus* (*F. asperifolia*, *F. barteri*, *F. exasperata*, *F. lingua*, *F. mucoso*, *F. natalensis*, *F. ottoniaefolia*, *F. polita*, *F. sansibarica*, *F. saussureana*, *F. sur*, *F. thonningii*, *F. vallis-choudae* y *F. variifolia*) en Uganda, con el fin de detectar flavonoides vacuolares y determinar variación química intraespecífica. 39 compuestos fenólicos fueron identificados y caracterizados, incluyendo 14 flavonoles O-glucósidos, 6 flavonas O-glucósidos y 15 flavonas C-glucósidos. Concluyendo que los perfiles de flavonoides son suficientemente distintos, lo cual podría ayudar en futuras identificaciones.

Sharaf y colaboradores (2000), estudiaron los perfiles de flavonoides de las especies *F. altissima*, *F. nítida*, *F. carica* y *F. pseudosycamonus*. En Egipto, donde se identificaron y confirmaron seis flavonoides metilados en la especie *Ficus altissima*. Concluyendo que la química de los flavonoides podría desempeñar un rol importante en la sistemática del género.

1.3.2. Marco teórico

La familia Moraceae se ubica taxonómicamente en el orden Rosales junto a las familias Barbeyaceae, Cannabaceae, Dirachmaceae, Elaeagnaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Ulmaceae y Urticaceae (esta última incluye Cecropiaceae) (Zhang *et al.*, 2011). La familia Moraceae se considera monofilética con base en información molecular; los caracteres diagnósticos de la familia son: exudado lechoso, ovario con placentación apical y óvulos anátropos (Sytsma *et al.*, 2002). Clement & Weiblen (2009), dividen la familia en seis tribus: Artocarpeae, Castilleae, Dorstenieae, Ficeae, Maclureae y Moreae. Está constituida por árboles grandes, arbustos, hemiepifitas, lianas e incluso algunas hierbas (Pelozo *et al.*, 2005). Ocupando diferentes rangos altitudinales, latitudinales y de hábitats (figura 1.1), a veces particulares para cada especie (Cardona-Peña *et al.*, 2005). En el continente Americano se distribuye desde los Estados Unidos hasta Argentina y Uruguay (Zuloaga *et al.*, 2007; Tropicos, 2010, como se cita en Franco, 2010).

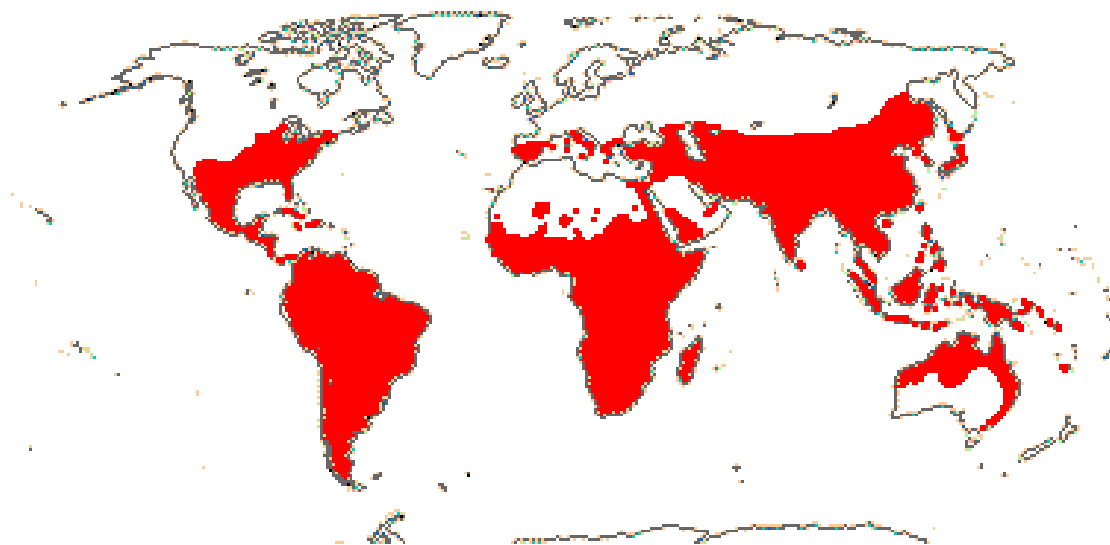


Figura 1.1 Distribución de la familia Moraceae. Fuente: (APG, IV., 2016). Disponible en <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Consultada: 25/05/2020

1.3.2.1. Género *Ficus* L.

El género *Ficus* apareció hace alrededor de 80 a 90 millones de años, y ha experimentado una radiación filogenética reciente, que muestra enorme diversidad de formas vegetales (árboles, arbustos, lianas, hemiepipfitas, estranguladores, enredaderas), tamaño de las plantas, tipos de frutos y diferente ecología. El género es considerado un taxón monofilético, y su característica más distintiva es que sus diminutas flores y frutos se disponen dentro de la superficie interna de un receptáculo (sicono o higo) casi totalmente cerrado, excepto por un orificio pequeño y apical denominado ostiolo (Jousselin *et al.*, 2003; Datwyler & Weiblen, 2004).

➤ Distribución y Filogenia

Con aproximadamente 750 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (figura 1.2), es uno de los géneros más importantes en las selvas tropicales, con alta diversidad alfa (Harrison, 2005). En América, las especies de *Ficus* amazónicas muestran alta diversidad morfológica en comparación con especies de los bosques del Atlántico. Los higos amazónicos comprenden unas 50 especies de árboles grandes y pequeños, con gran variedad de hojas y siconos (inflorescencias, frutos), de bajo endemismo y la mayoría de las especies amazónicas también se encuentran en las Antillas, Mesoamérica y Norteamérica, para Colombia, especialmente en la zona caribe se reportan 13 especies del género (Rangel-Ch, 2012), incluidas las cuatro especies de este estudio.

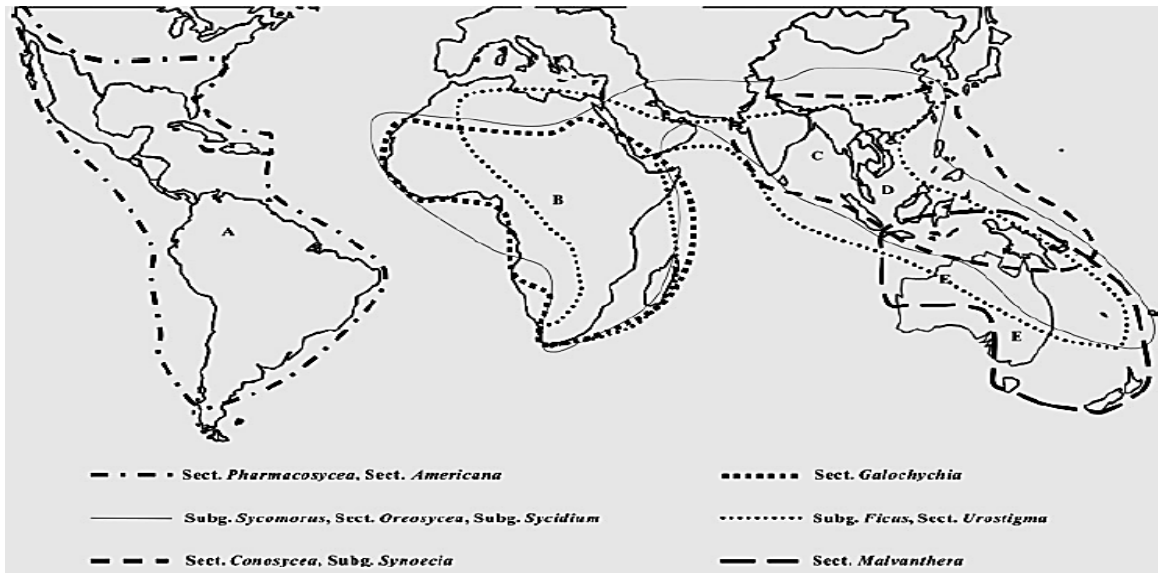


Figura 1.2 Distribución mundial de las secciones del género *Ficus*, (basada en la descripción de distribución del género *Ficus*, (Berg & Corner, 2005) y la red de figuras: <http://www.figweb.org/Ficus/index.htm>). **A)** América Neotropical; **B)** África, incluida Madagascar, las islas adyacentes del Océano Índico y la Península Arábiga; **C)** India – Asia; **D)** Malasia, incluido el archipiélago malayo, Nueva Guinea e islas del Pacífico; **E)** Australia (norte de Australia e islas del Pacífico), Fuente: (Xu *et al.*, 2011).

Las plantas de este género han ocupado muchos nichos ecológicos y representan una importantísima fuente de alimento durante todo el año para los frugívoros; por lo tanto, desempeñan un rol importante en los ecosistemas y se consideran como especies clave en las selvas tropicales (Herre & Jander, 2008). A pesar de su importancia ecológica, la historia evolutiva del género sigue siendo incierta. Varios estudios han intentado reconstruir la filogenia del género, utilizando distintos métodos, como la secuenciación de marcadores de cloroplastos (Herre *et al.*, 1996), espaciadores de transcritos externos y / o transcritos internos (ETS, ITS), (Weiblen., 2000; Jouselin *et al.* 2003), combinación de marcadores nucleares (Rønsted *et al.*, 2005; Rønsted *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011; Cruaud *et al.*, 2012; Pederneiras *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Clement *et al.*, 2020) o secuenciación de última generación de genomas en cloroplastos (Bruun-Lund *et al.*, 2017), sin embargo, estas investigaciones no resolvieron con éxito las bases de la filogenia del género, por lo tanto, no hay un consenso claro sobre las relaciones entre los principales grupos de *Ficus* (Rasplus *et al.*, 2020).

A pesar de la discrepancia anteriormente descrita, en el neotrópico, las especies del género aparecen claramente separadas en dos secciones monofiléticas (Rønsted *et al.*, 2007; Rønsted *et al.*, 2008), una sección especial *Americanae* (Miq.) Corner, con aproximadamente 120 especies, compuesta por estranguladoras hemiepifitas y la sección *Pharmacosycea* (Miq.) Benth. & Hook.F, con 20 especies, incluyendo en su mayoría árboles de gran tamaño. A pesar de la diversidad e importancia del género en el neotrópico, los estudios filogenéticos se han centrado solo en la sección *Pharmacosycea* (Honorio Coronado *et al.*, 2014; Pederneiras *et al.*, 2015; Costa *et al.*, 2017). Pocos estudios se han enfocado en la filogenia y diversificación de la sección *Americanae*. En consecuencia, se sabe poco sobre el origen y la variación de las especies de *Ficus* neotropicales pertenecientes a esta sección, esto podría mejorar nuestra comprensión de patrones y procesos de diversificación en los bosques tropicales, donde, cerca de la mitad de las especies del género son plantas leñosas hemiepifitas (Berg & Corner, 2005; Harrison, 2005), un hábito de crecimiento que podría haber evolucionado independientemente en los *Ficus* (Jousselin *et al.*, 2003), y que puede relacionarse con la capacidad de diversificar y colonizar nuevas áreas en selvas tropicales neotropicales.

➤ Biología reproductiva

Las especies del género son conocidas por sus relaciones con sus avispas polinizadoras (Agaonidae), de hecho, los *Ficus* y agaonidos han sido mutualistas obligados (Cruaud *et al.*, 2012). La avispa proporciona servicios de polinización al *Ficus*, mientras que el *Ficus* proporciona sitios de reproducción para las avispas, y ninguno de ellos puede reproducirse sin el otro (Cook & Rasplus, 2003). El 48% de las especies de *Ficus* son dioicas, mientras que el 52% son monoicas. Las especies dioicas, presentan flores masculinas (producción de polen) y flores femeninas (producción de semillas) de manera individual. En árboles con higos masculinos las flores estaminadas presentan un estilo corto, lo que favorece a las avispas polinizadoras; estas llegan al interior de las flores mediante su órgano ovopositor, consiguiendo depositar huevos en todas las flores, que luego eclosionan liberando avispas que cargan con el polen al abandonar el *Ficus* natal. Por su parte, los árboles hembras producen higos con flores pistiladas, cuyo estilo es de mayor tamaño, lo que afecta directamente la ovoposición de las avispas polinizadoras, debido a que el

órgano ovopositor no alcanza el interior de las flores. Sin embargo, sí se logra la polinización en el proceso de intentar depositar sus huevos.

Los higos de árboles hembras son trampas para los polinizadores, ya que no logran reproducirse; la razón por la que las avispas del higo no evitan los higo con flores femeninas, es por un engaño que induce la entrada de las avispas, como resultado de la imitación exacta de los higos masculinos, en características como tamaño, color y las señales químicas o liberación de compuestos volátiles que los polinizadores detectan (Van Noort & Rasplus, 2020).

En las especies monoicas, tanto las funciones reproductivas femeninas como masculinas están contenidas en el mismo higo, pero las fases reproductivas femeninas y masculinas están separadas en periodos de tiempo entre 3 y 20 semanas. Las avispas polinizadoras del higo viven solo unos pocos días, lo que significa que la descendencia del polinizador lleva a cabo la dispersión del polen (Van Noort & Rasplus, 2020). En cuanto al tipo de polinización, puede ocurrir de dos formas: activa o pasiva (Kjellberg *et al.*, 2001). En las especies polinizadas pasivamente, las avispas emergentes son polvoreadas con polen antes de abandonar su *Ficus* natal; mientras que en los *Ficus* polinizados activamente, las avispas usan sus patas para recolectar el polen, que luego depositarán en flores de otras especies de *Ficus* receptivas, mientras realizan sus ovoposición (Rasplus *et al.*, 2020).

➤ Divergencia y Diversificación

La mayor parte de la divergencia en los *Ficus* neotropicales tuvo lugar en los bosques lluviosos y sucedió en los últimos 16 millones de años. De hecho, altos niveles de lluvia, temperatura y la heterogeneidad del hábitat se han correlacionado con alta la riqueza de especies, y fueron las óptimas condiciones climáticas del mioceno medio que permitieron la expansión de las selvas tropicales en América (Morley, 2000; Zachos *et al.*, 2001). Todos los eventos geográficos y climáticos en el neotrópico probablemente influyeron de manera directa en la diversificación del género. Un análisis de la tasa de diversificación del género *Ficus*, realizado por Bruun-Lund y colaboradores, en el año 2017, indicó que las especies del género siguen un modelo de evolución con una acumulación gradual de especies a lo largo del tiempo, con tasas de extinción muy bajas y sin cambios evolutivos significativos, denominado “modelo de museo”.

Sin embargo, la falta de una hipótesis filogenética fundamentada para el género *Ficus*, ha obstaculizado el progreso de investigaciones relacionadas con la diversificación, la biogeografía y las interacciones entre especies. A pesar del aumento constante en los datos genéticos y el muestreo de especies durante la última década, en el trabajo filogenético, el estado actual de la filogenia del género no proporciona suficiente resolución para resolver sin ambigüedades las relaciones entre las especies del género *Ficus*, dejando así la base fundamental de la filogenia sin resolver (Cruaud *et al.*, 2012b; Herre *et al.*, 2008, como se cita en Bruun-Lund *et al.*, 2017).

1.3.2.2. Fitoquímica del género.

Las investigaciones fitoquímicas han demostrado que el género *Ficus* contiene mayoritariamente compuestos fenólicos y flavonoides (Veberic *et al.*, 2008), también se informa la presencia de terpenos (Yi-Ming *et al.*, 2005) y esteroides (Nawaz *et al.*, 2020). A pesar de la gran cantidad de fitoconstituyentes presentados en especies del género, la información referente a los alcaloides es limitada, sin embargo se describen varios de estos metabolitos en algunas especies de *Ficus* L (Zheng-Feng *et al.*, 2016).

➤ Flavonoides

Las especies del género *Ficus* contienen compuestos fenólicos como los flavonoles y flavonas, en estructuras como hojas, frutos y corteza. También se han reportado un gran número de flavonoides como la quercetina y luteolina. En la tabla 1.1 se evidencian flavonoides descritos en algunas especies del género.

Tabla 1.1 Flavonoides descritos en algunas especies del género *Ficu*. Fuente: (Nawaz *et al.*, 2020; y autores citados en el documento).

Especies	Metabolito secundario	Nombre del fitoconstituyente	
<i>F. religiosa</i>	Flavonoides	Leucocianidin-3-O- β -glucopiranosido. Leucopelargonidin-3-O- β -d-glucopiranosido. Leucopelargonidin-3-O- α -l-rhamnopiranosido.	
	Flavonoles	Kaempferol. Quercetina. Miricetina.	
<i>F. auriculata</i>	Flavonoles	Kaempferol. Quercetina. Miricetina.	
<i>F. sycomorus</i>	Flavonoides	Quercetin 3-O-l-rhamnopiranosil (1-6)- β -d-glucopiranosido. Quercetin 3-O- β -d-glucopiranosido Quercetin 3,7-O- α -l-dirhamnósido.	
<i>F. microcarpa</i>	Flavonoides	Catequina. Epicatequina. Isovitexina.	
<i>F. retusa</i>	Flavonoles	Luteolina. Afzelequina Catequina. Vitexina.	β -amirin acetato. Moretenona. β -amirin.
<i>F. deltoidea</i>	Flavonoles	Conrauidienol. Dihidroflavonol. Conraui flavonol.	
	Flavonoides	Luteolina. Catequina.	Epigallocatequina. Orientina.

Es posible observar la presencia de flavonoides comunes a algunas especies, los cuales son compuestos muy conocidos, tales como la Catequina, la Quercetina y sus derivados glucosilados, y el Kaempferol (figura 1.4).

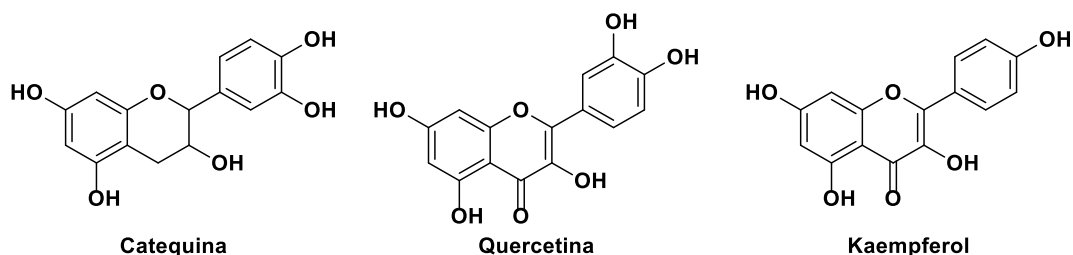


Figura 1.3 Estructuras de flavonoides comunes en algunas plantas del género *Ficus*.

➤ Terpenos y/o esteroides

Los terpenos están ampliamente distribuidos en el género *Ficus* L; la mayoría de estos tienen estructuras como: taraxastano, lupano, oleano o ursano (figura 1.5). Por su parte, se han aislado esteroides de diferentes especies del género, siendo los más comunes el estigmasterol y sitosterol. En la tabla 1.2 se representan algunos los terpenos y esteroides descritos en especies del género *Ficus*.

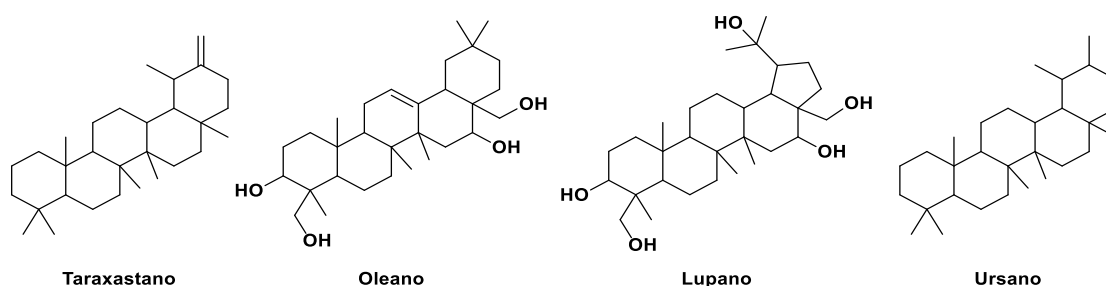


Figura 1.4 Estructuras de los terpenos con núcleo estructural más común en algunas plantas del género *Ficus*,

Tabla 1.2 Terpenos y esteroides descritos en algunas especies del género *Ficus*. Fuente: (Mbosso *et al.*, 2012; Nawaz *et al.*, 2020).

Especies	Metabolito secundario	Nombre del fitoconstituyente	
<i>F. religiosa</i>	Esteroides	Bergapteno.	β -sitosterol.
		Bergaptol.	Estigmasterol.
		Lanosterol.	β -sitosterol-dglucósido.
<i>F. auriculata</i>	Esteroides	Estigmasterol.	
		Bergapteno.	
		Escopoletina.	
<i>F. carica</i>	Esteroides	Taraxasterol.	
		Psoraleno.	
		Bergapteno (5-methoxypsoralen).	
<i>F. bengalensis</i>	Esteroides	β -Sitosterol- α -d-glucosa.	
		Meso-inositol.	
<i>F. retusa</i>	Esteroides	β -Sitosterol.	
		Friedelenol.	
<i>F. elastica</i>	Esteroides y Terpenos	Estigmasterol.	Friedelin.
		β -sitosterol.	Friedelinol.

➤ Alcaloides

Los alcaloides son compuestos complejos de carbono y nitrógeno. Las hojas de higuera son una importante fuente del subgrupo de alcaloides conocidos como fenantroindolizidina, se reportan en las hojas de dos especies: *F. septica* y *F. hispida* (Damu *et al.*, 2009; Peraza-Sánchez *et al.*, 2002), en la especie *F. benjamina* se identificaron 28 alcaloides en las hojas y 14 en corteza, clasificándose en las clases isoquinolina, indol, piridina, carbazol, quinolizidina, dolizidina y pirrolizidina (Novelli *et al.*, 2014). Por otra parte, en las hojas y corteza de *F. fistulosa* se determinaron 2 nuevos alcaloides del tipo septicina, denominados fistulopsinas A y B (figura 1.6), de igual manera se indicó la presencia de los alcaloides fenantroindolizidina, septicina, tiloforina y volmifoliol (Yapa *et al.*, 2016), en las hojas de *F. hispida* se encontraron 4 tipos de alcaloides, llamados ficushisminas A-D (Xin-Yu *et al.*, 2020).

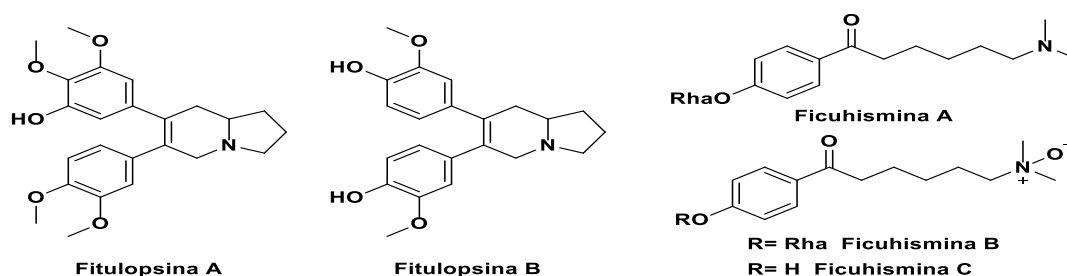


Figura 1.5 Estructuras de algunos alcaloides presentes en algunas plantas del género *Ficus*.

1.3.2.3. Quimiotaxonomía en plantas.

La ciencia de la quimiotaxonomía o taxonomía química se utiliza para la clasificación de plantas, sobre la base de sus componentes químicos. Todos los organismos vivos producen metabolitos secundarios, derivados del metabolismo primario. Las estructuras químicas de los metabolitos secundarios y sus vías biosintéticas son a menudo específicas y restringidas taxonómicamente en organismos relacionados y, por lo tanto, útiles en la clasificación (Ankanna *et al.*, 2012; Singh, 2016).

Dos amplias categorías de compuestos utilizados en la quimiotaxonomía son los metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios son los compuestos que están involucrados en las rutas metabólicas fundamentales, la mayoría son de ocurrencia universal y utilizados por la planta para el crecimiento y el desarrollo (Singh, 2010). Estos compuestos son ubicuos en la naturaleza y por lo tanto desempeñan un papel poco importante en la clasificación taxonómica. Los productos del metabolismo secundario, por el contrario, generalmente son de baja concentración, pero de alto valor quimiotaxonómico, en estos se incluyen sustancias como alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, esteroides y/o terpenos (Rehana & Nagarajan, 2014) y pueden ser utilizados para la protección y defensa contra depredadores y patógenos. Además, son de ocurrencia restringida y por lo tanto muy útiles para la clasificación taxonómica; de todos los compuestos secundarios, los flavonoides son los que más se han utilizado con fines taxonómicos.

Los flavonoides son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos (A y B), unidos por un puente de tres átomos de carbono (figura 1.7), con la estructura general C6-C3-C6 (Yi *et al.*, 2011).

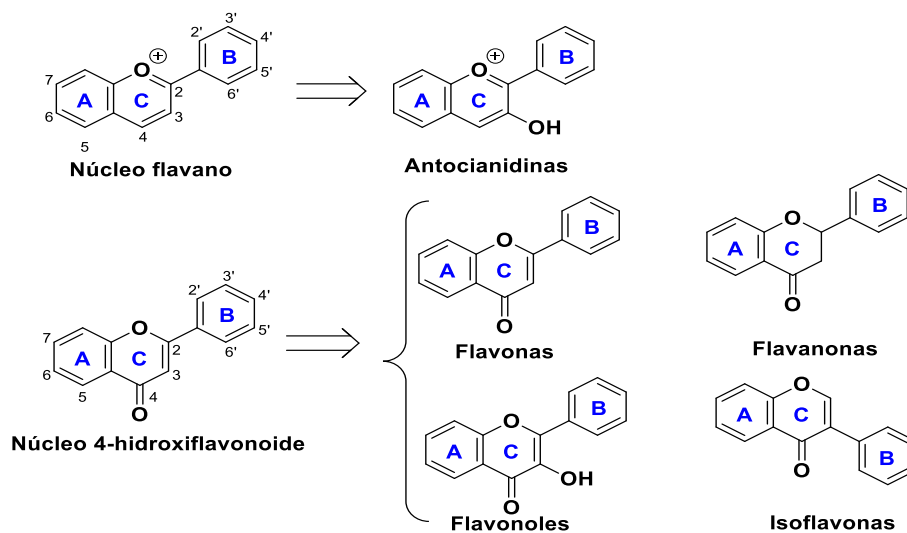


Figura 1.6 Clasificación y estructura de flavonoides. Fuente: (Yi *et al.*, 2011).

En forma natural suelen presentar, al menos, tres hidroxilos fenólicos y se encuentran, generalmente, combinados con azúcares en forma de glucósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas libres. Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo con la sustitución del anillo C. En esta clasificación son de suma importancia el estado de oxidación del anillo heterocíclico y la posición del anillo B (Papetti *et al.*, 2006; Behera *et al.*, 2008).

➤ Origen biosintético de los Flavonoides

Los flavonoides se forman mediante la combinación de derivados sintetizados a partir de la fenilalanina (a través de la vía del ácido shikímico) y ácido acético. La fenilalanina se transforma en ácido trans-cinámico, que luego se hidroxila a ácido p-cumárico (C-9), este se condensa con tres unidades de malonil-CoA para formar una chalcona, que es un flavonoide de anillo abierto, luego ocurren varios cierres del anillo, reducciones y deshidrataciones, para dar lugar a diferentes clases de flavonoides. En la figura 1.8 se ilustra la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios.

Las modificaciones estructurales finales, implican la adición de grupos funcionales como los hidroxilos, metóxilos, metilos, sulfatos, prenilos, metilandioxilos, isoprenilos, entre otros. La complejidad estructural adicional es introducida por la presencia de glucósidos. La glicosilación de un compuesto fenólico o grupo hidroxilo alcohólico de una aglicona en un flavonoide, puede ocurrir a través del enlace hemiacetal (O-glucósidos) o unión directa al C-1 del azúcar, mediante un enlace carbono-carbono (C-glucósidos). Algunos monosacáridos, como D-glucosa y L-ramnosa, que son los más comunes y como la galactosa, xilosa y arabinosa, que son los menos frecuentes, incluso combinaciones entre ellos (di- y trisacáridos), pueden unirse a la aglicona del flavonoide en diferentes posiciones, de manera que la enorme cantidad de flavonoides encontrados en la naturaleza, se debe a las innumerables combinaciones entre las unidades de azúcares y las agliconas de los flavonoides. (Andersen & Markham, 2006; Pistelli & Giorgi, 2012).

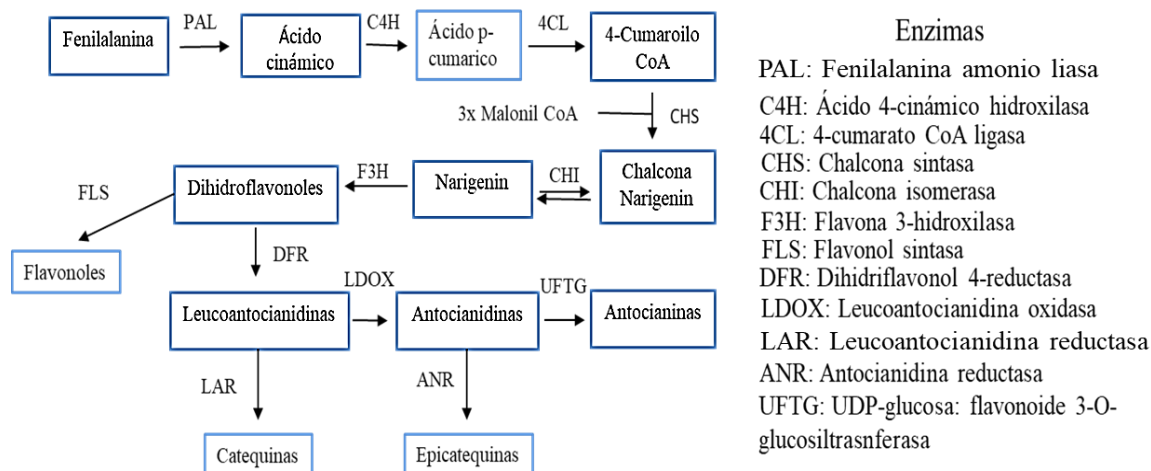


Figura 1.7 Ruta biosintéticas de los flavonoides. Fuente (Ravaglia *et al.*, 2013).

1.3.2.4. Técnicas de separación y análisis cromatográfico.

La separación de los compuestos presentes en un extracto, representa un reto para el proceso de identificación y caracterización química de los mismos, por esta razón a través de los años, se han desarrollado diferentes métodos efectivos y selectivos que permiten alcanzar estos objetivos. Estos trabajos de separación e identificación empiezan con la extracción de los metabolitos secundarios, la cual puede lograrse con métodos de extracción, empleando solventes, mediante destilación, mediante prensado, por sublimación, entre otros; siendo la extracción con solventes, la más utilizada (Qing-Wen *et al.*, 2018). Los alcoholes como etanol y metanol son considerados los "solventes universales" en los procesos de extracción. Aunque la escogencia del solvente es un factor crucial en la extracción. Existen diversas técnicas dentro de los métodos de extracción con solventes, algunas de las cuales son muy sencillas, rápidas y económicas, como por ejemplo la maceración, la percolación, la decocción, la extracción con soxhlet; además existen otras técnicas más sofisticadas, como por ejemplo la extracción con fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas, la extracción asistida por ultrasonido o la extracción asistida enzimáticamente, (Ingle *et al.*, 2017; Qing-Wen *et al.*, 2018).

Existen diversos métodos para la separación y obtención de los metabolitos secundarios, ya sea como mezclas, fracciones menos complejas o como compuestos puros, siendo los métodos cromatográficos los más utilizados. Las diferentes técnicas cromatográficas se basan en la

separación de moléculas debido a diferencias en su tamaño, forma o carga, mediante diferentes mecanismos que involucran principalmente fenómenos de adsorción, partición, intercambio iónico o exclusión por tamaño (Coskun, 2016). En general, la cromatografía implica mover una muestra a través del sistema (o fase móvil) sobre una fase estacionaria. Las moléculas en la muestra tendrán diferentes afinidades e interacciones con el soporte estacionario, lo que conducirá a la separación de las moléculas. Los componentes de muestra que presentan interacciones fuertes con la fase estacionaria serán mucho más retenidos por esta, en comparación con los componentes con interacciones débiles (Portilla & Salinas, 2009). La polaridad de la fase estacionaria, determina la naturaleza de estas técnicas de separación ya que, si esta es una sustancia polar se hace necesario el uso de fases móviles menos polares y por tanto hablamos de *cromatografía en fase normal*; si por el contrario la fase estacionaria es apolar, se hace necesario el uso de fases móviles más polares y por tanto hablamos de *cromatografía en fase reversa* (Nowakowska *et al.*, 2018).

- Cromatografía de capa fina o capa delgada (CCF o CCD, por sus siglas en inglés) y Cromatografía en columna (CC)

La CCD es una técnica cromatográfica de adsorción, en la que la muestra se separa en función de la interacción de los compuestos con la fase estacionaria, la cual es un material adsorbente (gel de sílice) soportado en una placa de aluminio, plástico, vidrio u otro material inerte, mientras fluye por capilaridad la fase móvil, (figura 1.9). Esta técnica brinda de manera rápida y fácil información cualitativa sobre la mezcla de compuestos a separar y su polaridad; además sirve de apoyo y monitoreo de otras técnicas cromatográficas, como por ejemplo la cromatografía de columna. La cromatografía en columna (CC) es usada para la separación de metabolitos secundarios y se basa en las diferencias entre las afinidades de adsorción de los compuestos con la superficie del adsorbente o fase estacionaria usada, saliendo primero de la columna aquellos compuestos que presentan menos afinidad, (figura 1.10). La afinidad entre los compuestos y la fase estacionaria se da principalmente por interacciones de tipo enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo, (Qing-Wen *et al.*, 2018), es por eso que la selección del adsorbente y de la fase móvil es de suma importancia para lograr una buena separación de los compuestos.

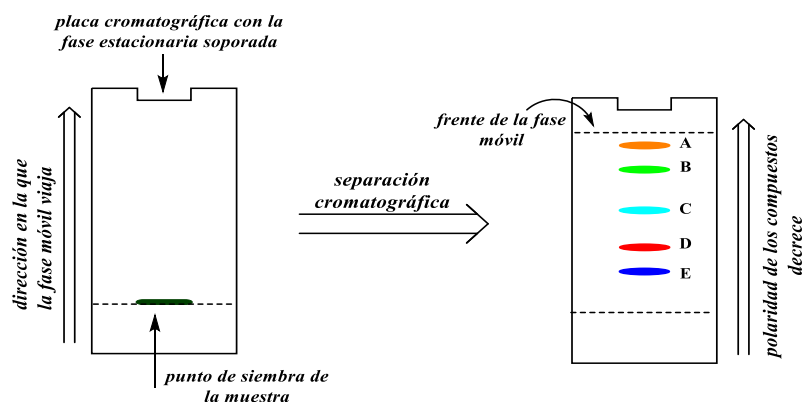


Figura 1.8 Representación de la separación de compuestos por cromatografía en capa delgada.

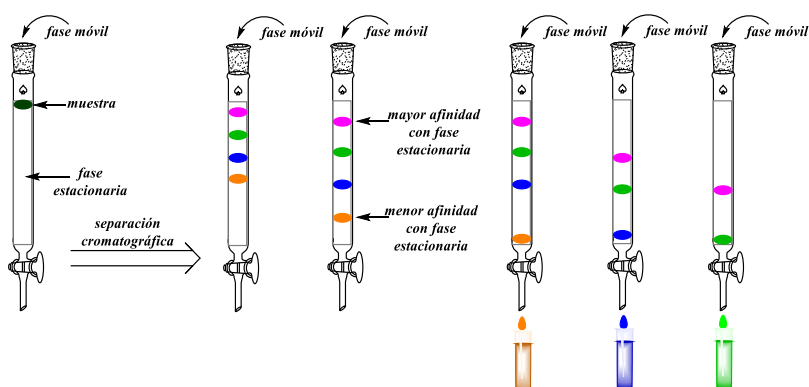


Figura 1.9 Representación de la separación de compuestos por cromatografía en columna.

➤ Cromatografía de Gases (CG o GC, por sus siglas en inglés)

La cromatografía de gases (CG), se utiliza en la separación y análisis de mezclas de componentes múltiples y complejas, como aceites esenciales, hidrocarburos, solventes, entre otras. El principio de la cromatografía de gases es la adsorción y la partición; en esta técnica, una muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de la columna cromatográfica, como se muestra en la figura 1.11, donde es transportada a través de la columna por el flujo de fase móvil gaseosa inerte (gas de arrastre N_2 o He, a presión). La columna en sí contiene una fase líquida estacionaria que se adsorbe sobre la superficie de un sólido inerte. Los compuestos separados, llegan al detector de donde se

obtiene la información necesaria para el análisis de estos compuestos, mediante el respectivo cromatograma (Al-Rubaye *et al.*, 2017).

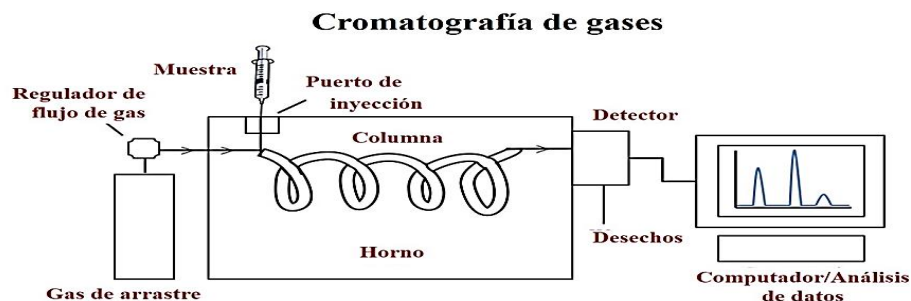


Figura 1.10 Representación de la separación de compuestos por cromatografía de gases. Imagen tomada y modificada de Bitesize Bio (web site). [Imagen disponible en <https://bitesizebio.com/28687/carrying-gas-chromatography/>].

Para conseguir la identificación de los compuestos separados mediante la cromatografía de gases, es necesario utilizar una técnica complementaria como la espectrometría de masas (EM o MS, por sus siglas en inglés), el cual funciona como un detector y brinda información sobre la masa molecular de los compuestos que van saliendo del cromatógrafo de gases, de igual manera puede dar información sobre algunas características estructurales de estos compuestos, y sirve para detectar la presencia de compuestos conocidos o para determinar la concentración de los compuestos en la mezcla separada (Al-Rubaye *et al.*, 2017). La técnica acoplada CG-EM (GC-MS) resulta extremadamente útil para el análisis de compuestos tipo ésteres, ácidos grasos, alcoholes, aldehídos, terpenos, esteroides y otros compuestos volátiles y semivolátiles, ya que combina el excelente poder de separación de la CG con la identificación basada en la medición precisa de masas de la EM (Špánik & Machyňáková, 2017).

➤ **Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE o HPLC, por sus siglas en inglés)**

La técnica HPLC es muy versátil, robusta y ampliamente utilizada para la separación, identificación, cuantificación y purificación de metabolitos secundarios, así como de otras moléculas de interés biológico, como aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, esteroides, entre otras (Coskun, 2016). Esta es una técnica útil para compuestos que no se pueden vaporizar o que se descomponen a altas temperaturas, y proporciona un buen complemento a la cromatografía de gases para la detección de compuestos. Esta técnica separa los

compuestos en función de sus interacciones con la fase estacionaria, la cual está en una columna compacta y normalmente es de naturaleza no polar (*fase inversa*), y el solvente o fase móvil polar, generalmente una mezcla de agua y otro solvente (Ingle *et al.*, 2017). Los componentes esenciales de un dispositivo de HPLC se presentan en la figura 1.12. El éxito de la identificación de los compuestos analizados por HPLC, radica en la selección apropiada del detector, siendo los más utilizados los detectores UV por ofrecer una alta sensibilidad y porque la mayoría de los metabolitos secundarios tienen cierta absorbancia de luz ultravioleta. Los compuestos fenólicos como los flavonoides, normalmente se separan e identifican con HPLC, usando detectores de UV-VIS y detectores de matriz de fotodiodos (PDA), en longitudes de onda de 190-380 nm (Khoddami *et al.*, 2013).

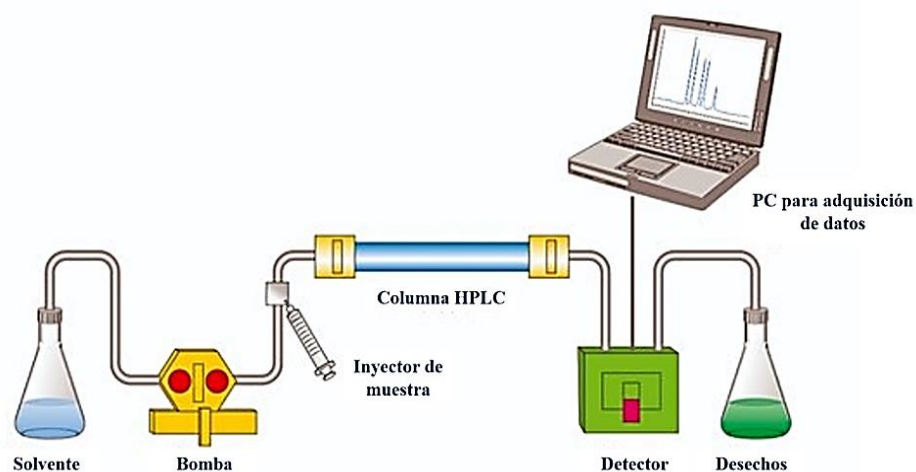


Figura 1.11 Representación de la separación de compuestos por HPLC. Imagen tomada y modificada de indiamart (web site). [Imagen disponible en <https://www.indiamart.com/proddetail/hplc-analysis-18659888373.html>].

1.4. Materiales y método

1.4.1. Fase de campo

1.4.1.1. Área de estudio.

El municipio de Planeta Rica, se encuentra localizado al Sur oriente del departamento de Córdoba, con coordenadas $8^{\circ} 17'15''$ N y $75^{\circ} 73'55''$ O. Limitando al norte con los municipios de Montería, San Carlos y Pueblo Nuevo, al sur con Buenavista y Montelíbano, se halla a una altitud promedio de 87 m, presenta una temperatura promedio de 28°C , la distancia de referencia de la estación meteorológica es de 52 Km, ubicada en el aeropuerto los Garzones del municipio de Montería (IDEAM, 2020). Las coordenadas de cada punto de muestreo se presentan en la tabla 1.3 y su ubicación en la figura 1.13.

Tabla 1.3 Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo.

Puntos de muestreo	Latitud	Longitud
<i>F. benjamina</i>	$8^{\circ} 23'09.57''$ N	$75^{\circ} 33'42.54''$ O
<i>F. insipida</i>	$8^{\circ} 23'54.46''$ N	$75^{\circ} 34'14.09''$ O
<i>F. elastica</i>	$8^{\circ} 24'55.63''$ N	$75^{\circ} 34'44.66''$ O
<i>F. bullenei</i>	$8^{\circ} 24'18.52''$ N	$75^{\circ} 34'38.73''$ O

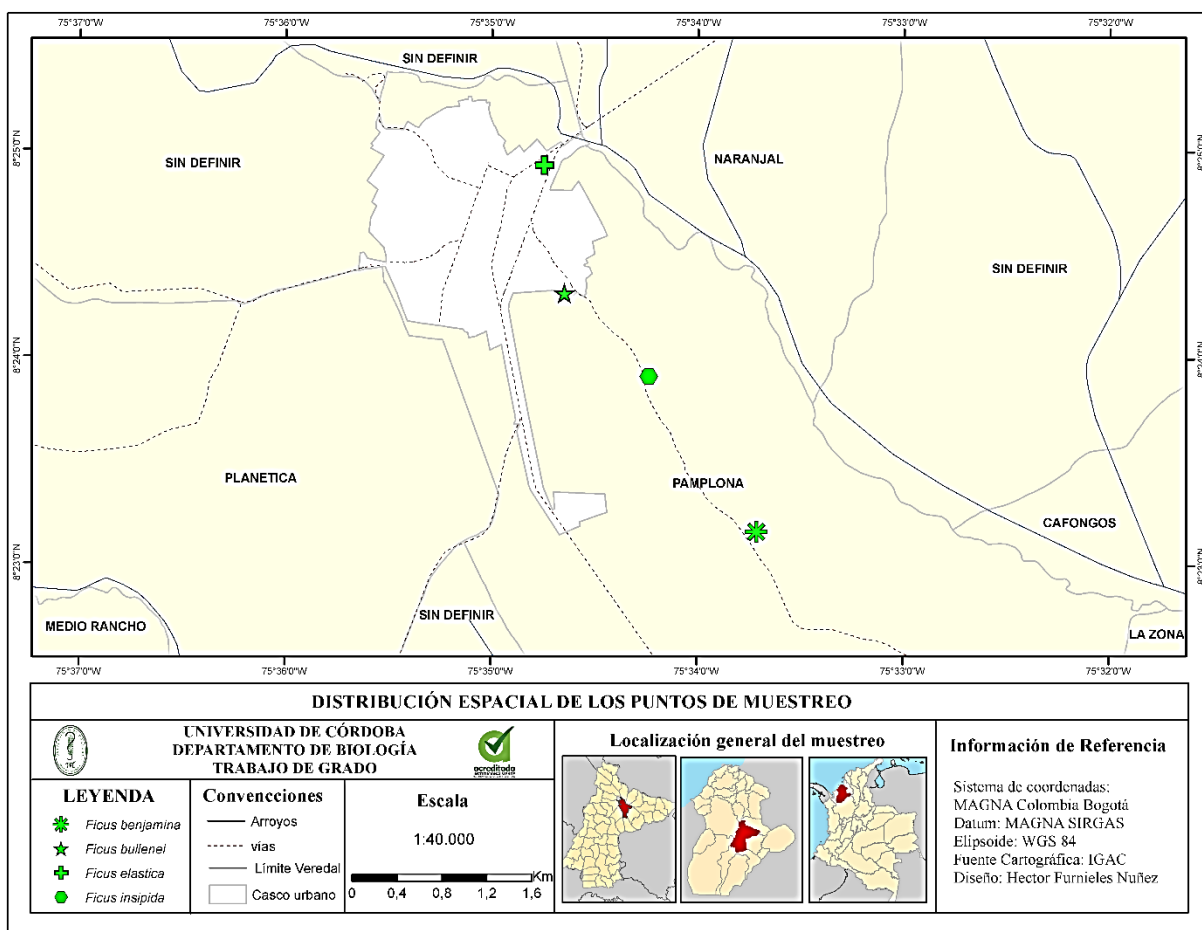


Figura 1.12 Ubicación de los puntos de muestreos en el área de estudio. Mapa elaborado por Furnieles-Núñez, 2019, ArcGIS V 10.3.4.

1.4.1.2. Recolección del material biológico.

Se recolectaron muestras foliares de las especies *F. benjamina*, *F. insipida*, *F. elastica* y *F. bullenei* en el municipio de Planeta Rica, Córdoba. Posteriormente se realizó la identificación taxonómica de las especies, (Anexo 1.1); empleando la guía de campo para familias y géneros de plantas leñosas del noroeste de américa del sur (Alwyn H. Gentry), comparaciones visuales con especímenes depositados en el herbario de la universidad de Córdoba (HUC) y en el herbario virtual de la Universidad Nacional de Colombia, además se realizaron cotejos de información taxonómica en la base de datos Tropicos Home, perteneciente al Missouri botanical garden. Finalmente las especies fueron depositadas en el herbario de la Universidad de Córdoba (HUC), con sus respectivos números de registro, (Anexo 1.2).

1.4.2. Fase de laboratorio

1.4.2.1. Preparación de los extractos etanólicos foliares.

Se secaron las hojas durante 5 días en un horno a temperatura controlada (40 °C), luego se procedió con la molienda para la pulverización del material, seguidamente se adicionó etanol (EtOH) al 96% al material de cada especie. Para obtener los extractos vegetales, se filtró y concentró en un rotavaporador a presión reducida en un rango de temperatura entre 45 °C y 48 °C, con el fin de separar el solvente (EtOH) y obtener los extractos.

1.4.2.2. Tamizaje fitoquímico preliminar.

Para realizar las pruebas fitoquímicas preliminares, se siguieron los protocolos establecidos en el grupo de investigación Química de los Productos Naturales de la Universidad de Córdoba, en la figura 1.13 se resume el procedimiento. De acuerdo a la presencia o no de precipitados formados y su abundancia, así como la aparición de coloraciones y su intensidad, se consideró la presencia de estos metabolitos como abundante (+++), moderado (++), escaso o dudoso (+) y negativo (-).

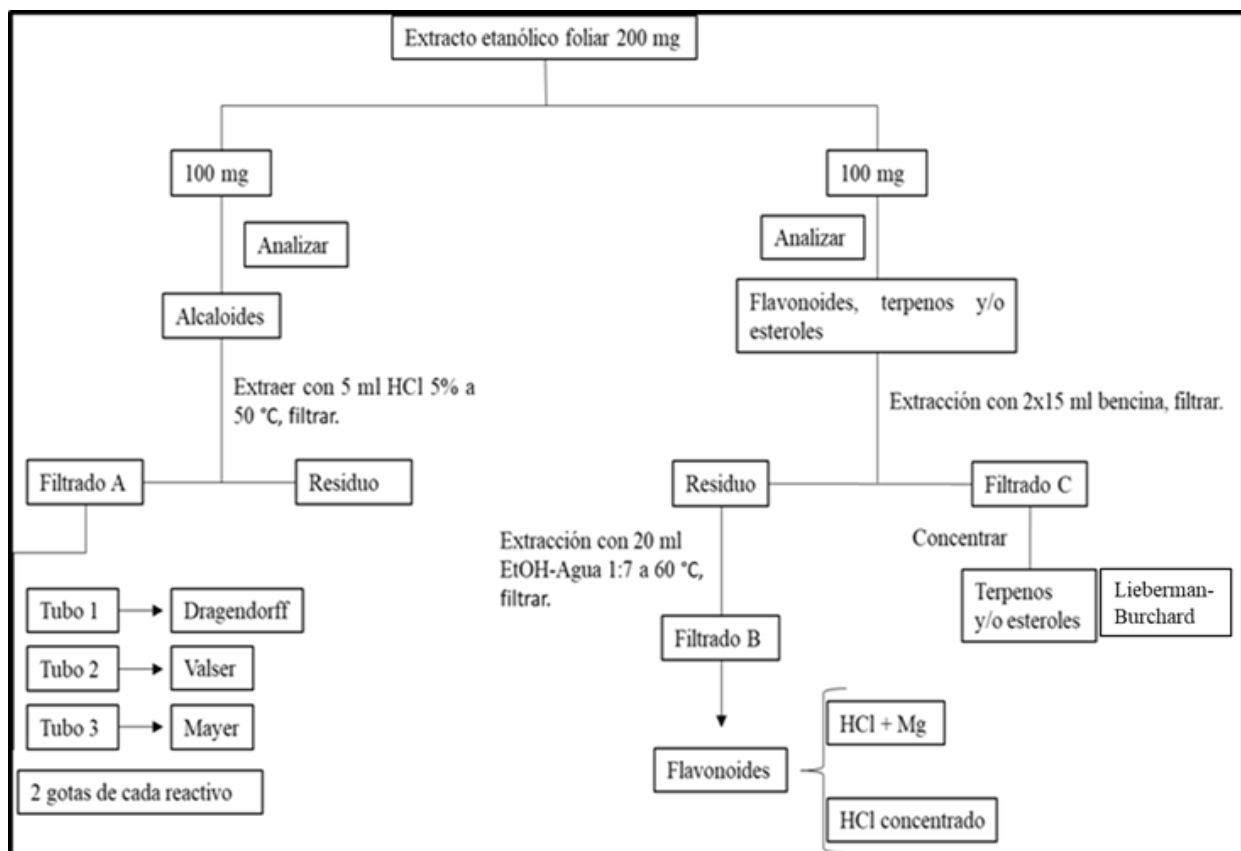


Figura 1.13 Procedimiento para el tamizaje fitoquímico.

➤ Pruebas para alcaloides

Se pesaron 100 mg de extracto etanólico y se disolvieron en 15 mL de HCl al 5% a 50 °C aproximadamente, luego se filtró y se obtuvo el filtrado “A”. A partir del filtrado “A”, se transfirió 1 mL a tres tubos de ensayos. Al tubo N° 1 se le adicionaron dos gotas de Reactivo de Dragendorff, al segundo tubo dos gotas de Reactivo de Mayer, al tercero dos gotas de Reactivo de Valser.

➤ Pruebas para terpenos y/o esteroides

Se tomaron 100 mg de extracto se extrajo con 2-3 volúmenes de 15 ml de bencina, luego se filtró para obtener un filtrado “C”. El residuo fue extraído con EtOH/H₂O 1:7 a 60°C, se filtró y el residuo se extrajo nuevamente con una mezcla hidroalcohólica. De esta forma se obtuvo la solución “B”, que se utilizó para el análisis de flavonoides.

El Filtrado “C” se concentró a 5 ml mediante rotaevaporación a presión reducida, y se adicionó a un tubo de ensayo que contenía 10 ml de una mezcla MeOH-H₂O 9:1, se agitó fuertemente y se dejó en reposo hasta observar la formación de dos capas. Una vez formadas las 2 capas, se retiró con una micropipeta la fase superior bencínica (Solución “C1”). Esta se monitoreó mediante cromatografía de capa delgada, con un sistema de elución hexano-Acetato de etilo (95:5) o bencina-acetato de etilo 1:1, luego se dejó evaporar el solvente y se asperjó con el reactivo de Lieberman-Burchard. Esta prueba es positiva para una variedad de colores, tonalidades rojas verdes y azules.

➤ Pruebas para Flavonoides

✓ *Reacción de la Cianidrina (HCl + Mg).*

En un tubo de ensayo se coloca 0,5g de magnesio en polvo, se adiciona 1 ml de la solución “B” y gota a gota ácido clorhídrico concentrado hasta terminar el desprendimiento de hidrógeno, luego de 10 minutos se observan los cambios (la formación de coloración rosada, roja, violeta o naranja es prueba positiva para sustancias que posean en su estructura el núcleo de la γ-benzopirona.

✓ *Reacción con HCl concentrado.*

Se transfiriere 1 ml de la Solución de “B” a un tubo de ensayo, se adiciona 0,5 ml de ácido clorhídrico concentrado y se coloca el tubo en baño de maría durante 10 - 15 minutos. Si en estas condiciones se obtiene una coloración roja, la prueba es positiva para leucoantocianidinas.

1.4.2.3. Fraccionamiento de extractos etanólicos foliares por partición

El método de partición se realizó a partir de 2 gramos de cada extracto etanólico foliar, estos se disolvieron en 20 ml de una mezcla etanol-agua (EtOH-H₂O) en proporción 1:1. Luego se adicionaron 2 volúmenes de 7 ml de acetato de etilo a cada extracto etanólico disuelto en la mezcla hidroalcohólica, seguidamente se separaron las fases de acetato de etilo, ubicadas en la parte superior de la mezcla, completando 14 ml aproximadamente por cada subextracto, luego se concentró en rotavaporación a presión reducida, en un rango de temperaturas entre 45-48 °C, de

esta manera se separó el solvente (acetato de etilo) y se obtuvieron los subextractos AcOEt, de cada una de la especies. A partir de los subextractos obtenidos, se procedió al monitoreo por cromatografía en capa delgada (CCD) y se sometieron a fraccionamiento cromatográfico, mediante la técnica de separación y purificación por cromatografía en columna.

1.4.2.4. Fraccionamiento Cromatográfico (Cromatografía en columna)

A partir del análisis por cromatografía en capa delgada de los subextractos obtenidos (acetato de etilo), se procedió a la separación de la(s) fracción(es) que contenía los compuestos de interés mediante la cromatografía en columna. Para la separación y fraccionamiento del subextracto AcOEt, se utilizó gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron mezclas de hexano: AcOEt en polaridad creciente, iniciando con hexano 100 % hasta hexano: AcOEt 1:1; como sistema final se utilizó una mezcla diclorometano-metanol DCM-MeOH 9:1, para remover la mayor cantidad de compuestos de la fase estacionaria. Constantemente se realizó un monitoreo constante con CCD usando como sustancias de referencia ácido gálico, y como reveladores cromatográficos una lámpara de luz U.V a 300nm y 245nm. Finalmente se reunieron las fracciones, teniendo en cuenta los perfiles cromatográficos en CCD de las muestras recolectadas de la columna.

1.5. Resultados y discusión.

1.5.1. Obtención de los extractos etanólicos foliares.

Las cantidades de extractos etanólicos foliares obtenidos, se muestra en la tabla 1.4. Observando rendimientos de extracción entre el 6.6 y el 10 %, siendo mayor para *F. elastica*. De cada uno de los extractos etanólicos se tomó la cantidad necesaria para la realización de los ensayos de tamizaje fitoquímico, fraccionamiento, separación cromatográfica y actividad antioxidante.

Tabla 1.4 Rendimiento y extracción de los extractos etanólicos foliares.

Especies	Peso fresco (g).	Peso seco (g).	Peso extracto (g).	Rendimiento de extracción (%).
<i>F. insipida</i>	143.1	48.4	4.4	9.0
<i>F. benjamina</i>	220.4	72.1	5.2	7.2
<i>F. elastica</i>	175.0	48.2	4.8	9.9
<i>F. bullenei</i>	226.7	86.7	5.8	6.6

1.5.2. Tamizaje fitoquímico.

Se realizaron pruebas cualitativas para metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, terpenos y/o esteroides, en los extractos etanólicos foliares de las especies *F. insipida*, *F. benjamina*, *F. elastica* y *F. bullenei*. Los resultados del tamizaje fitoquímico mostraron la presencia de flavonoides, terpenos y/o esteroides, al emplear los métodos de cianidrina (HCl + Mg), ácido clorhídrico concentrado (HCl 37%) y de Lieberman-Burchard respectivamente, los resultados fitoquímicos de esta investigación se presentan en la tabla 1.5, donde se clasifican como abundante (+++), moderado (++), escaso o dudoso (+) y negativo (-), en las diferentes pruebas realizadas. Las evidencias fotográficas se muestran en las figuras 1.15, 1.16 y 1.17, donde se percibe la coloración rojiza en las pruebas para flavonoides, la ausencia de precipitado para alcaloides y la coloración verde-azulada en la prueba para terpenos y/o esteroides.

Tabla 1.5 Tamizaje fitoquímico para cada especie.

Metabolitos	Ensayo	<i>F. insipida</i>	<i>F. benjamina</i>	<i>F. elastica</i>	<i>F. bullenei</i>
Flavonoides.	HCl + Mg	++	++	+	+++
	HCl 37%	++	+++	++	++
	Dragendorff	-	-	-	-
Alcaloides	Mayer	-	-	-	-
	Valser	-	-	-	-
Terpenos y/o Esteroles	Lieberman-Burchard	++	++	+	+

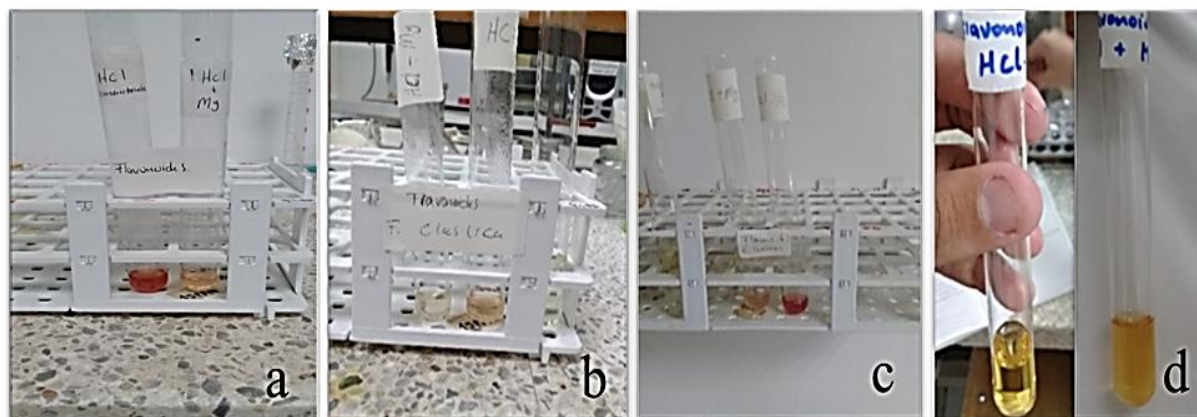


Figura 1.14 Pruebas para flavonoides, **a)** *F. benjamina*, **b)** *F. elastica*, **c)** *F. bullenei*, **d)** *F. insipida*.

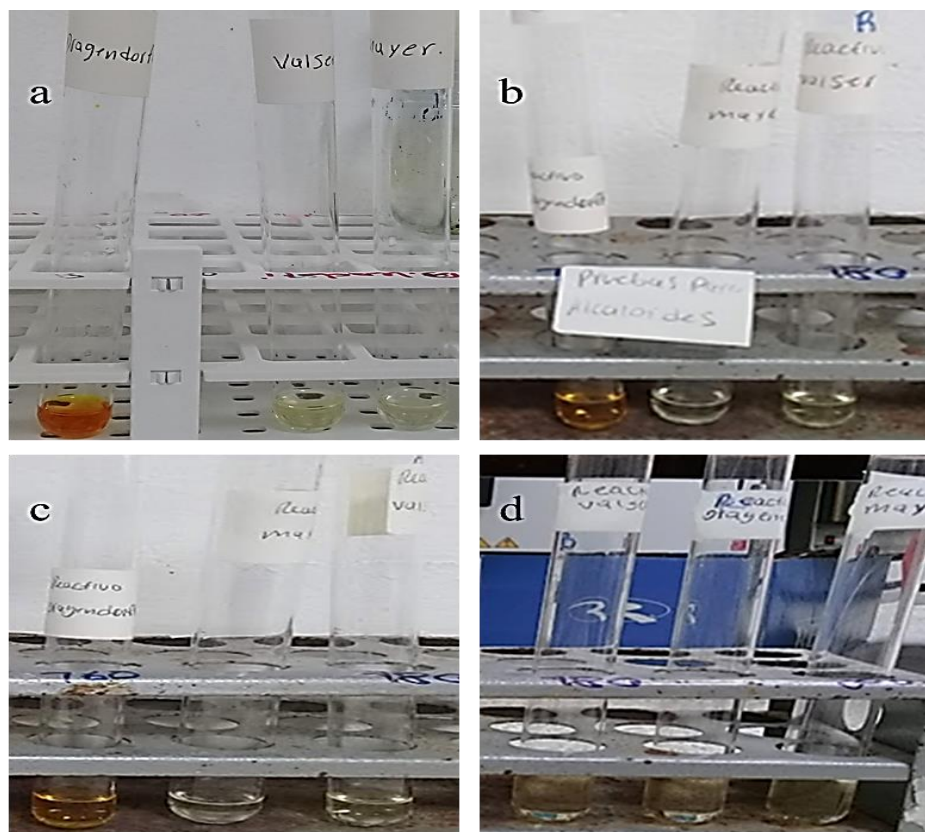


Figura 1.15 Pruebas para alcaloides, **a)** *F. insipida*, **b)** *F. benjamina*, **c)** *F. elastica*, **d)** *F. bullenei*

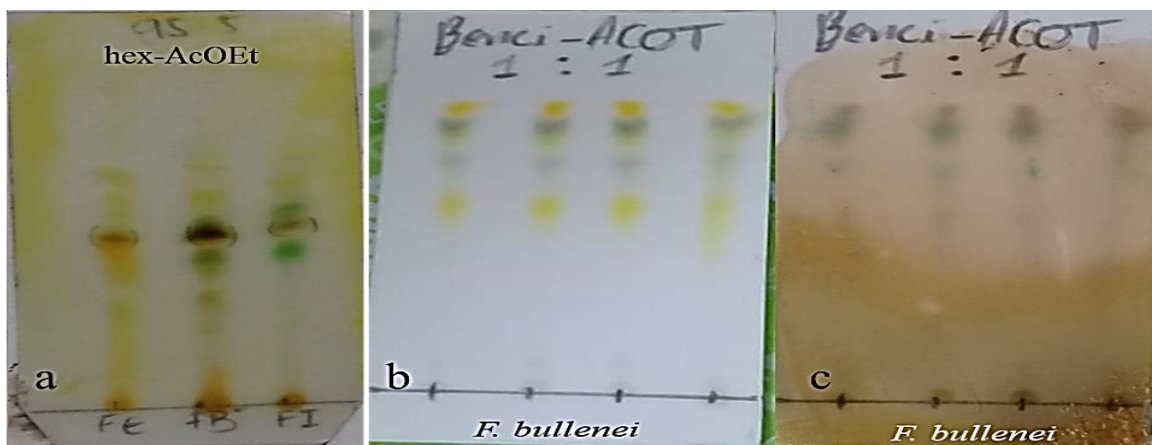


Figura 1.16 Cromatoplas para terpenos y/o esteroides, **a)** Placa con extractos etanólicos de *F. benjamina* (FB), *F. elastica* (FE) y *F. insipida* (FI), reveladas con Lieberman-Burchard, **b)** Placa con varias muestras de extracto etanólico de *F. bullenei*, sin revelar, **c)** Placa con varias muestras de extracto etanólico de *F. bullenei* revelada con Lieberman-Burchard.

Los resultados observados concuerdan con los obtenidos por Gintin y colaboradores (2020), donde presentan en sus análisis fitoquímicos, la presencia de fitoconstituyentes como esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides en las hojas de *Ficus elastica*. Por su parte, Sirisha y colaboradores (2010) e Imran y colaboradores (2012), informaron sobre la presencia de esteroides del tipo estigmasterol y flavonoides como la quercetina en las hojas de la especie *Ficus benjamina*, además Vejarano & Guerrero (2011), informan la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos y/o esteroides en los extractos foliares de la especie *Ficus insipida*. Para la especie *Ficus bullenei*, no se encontraron referencias de información fitoquímica.

El aporte de esta investigación, indicando la presencia de flavonoides, terpenos y/o esteroides en las hojas de esta última especie, es fundamental para adelantar investigaciones fitoquímicas futuras, con el fin de determinar un completo perfil químico, identificando en lo posible cada fitoconstituyente, o los mayoritarios, presentes en las hojas y otras estructuras vegetales, como frutos y corteza.

Las pruebas cualitativas para alcaloides, Dragendorff, Mayer y Valser, arrojaron negativo para todos los extractos etanólicos foliares evaluados, estos resultados coinciden con los informados por Nurviana y colaboradores (2020), para la especie *Ficus elastica*, donde afirman que no se evidencia presencia de alcaloides en los extractos foliares de la especie, de igual manera, Vejarano & Guerrero (2011), no observaron la presencia de alcaloides en su análisis fitoquímico para extractos foliares de la especie *Ficus insipida*; para la especie *Ficus benjamina*, existen estudios que no informan la presencia de alcaloides en sus hojas, como lo indican los resultados obtenidos por Bravo & Acuña (2015). La contraposición a esto, son los resultados presentados por Novelli y colaboradores (2014), donde indican la presencia e identificación de 28 alcaloides en extractos foliares de la especie *Ficus benjamina*, los cuales se clasificaron en las clases isoquinolina, indol, piridina, quinolizidina, indolizidina, pirrolizidina y quinolina. Estos resultados fitoquímicos contradictorios, pueden estar relacionados con las condiciones ambientales, ecológicas y edafológicas donde crece y se desarrolla la especie.

1.5.3. Obtención de subextractos acetato de etilo por partición.

A partir de los extractos etanólicos foliares (2 gramos) se obtuvieron los subextractos (acetato de etilo) por partición, los resultados se muestran en la tabla 1.6. Una vez obtenidos los subextractos, se realizó cromatografía en capa delgada (CCD), usando como fase móvil la mezcla de hexano: acetato de etilo en proporción (7:3).

Tabla 1.6 Cantidad de subextracto obtenidos para cada especie

Especies	Peso del extracto etanólico foliar (g).	Pesos subextractos acetato de etilo (mg).
<i>F. insipida</i>	2	336
<i>F. benjamina</i>	2	365
<i>F. elastica</i>	2	327
<i>F. bullenei</i>	2	415

La mayor cantidad de subextractos de acetato de etilo, se obtuvo a partir de los extractos etanólicos de *F. benjamina* y *F. bullenei*, siendo de 365 y 415 mg, respectivamente. Para las especies *F. elastica* y *F. insipida*, la cantidad de todos los subextractos fue muy similar entre sí.

1.5.4. Técnicas Cromatográficas (CCD y CC) realizadas a los subextractos de acetato de etilo.

La técnica cromatografía en capa delgada, indicó el perfil cromatográfico de los subextractos de acetato de etilo de cada especie, empleando como fase móvil la mezcla de solventes hexano: acetato de etilo, en proporción 1:9; y como referencia el polifenol ácido gálico (AG). Esta técnica corroboró la presencia de manchas o compuestos en común y diferentes entre las especies, mediante revelado con lámpara de luz UV-visible, a 300 y 245nm. Debido a sus propiedades bioquímicas y moleculares, los compuestos fenólicos como los flavonoides, pueden ser determinados y cuantificados mediante luz UV-visible, gracias a la capacidad de absorción de los anillos fenólicos de sus estructuras químicas (Boulet *et al.*, 2017, como se cita en Aleixandre-Tudo

et al., 2019). En la figura 1.17 se muestra la comparación de la cromatografía en capa delgada de los extractos etanólicos crudos y la obtenida mediante la partición realizada anteriormente.

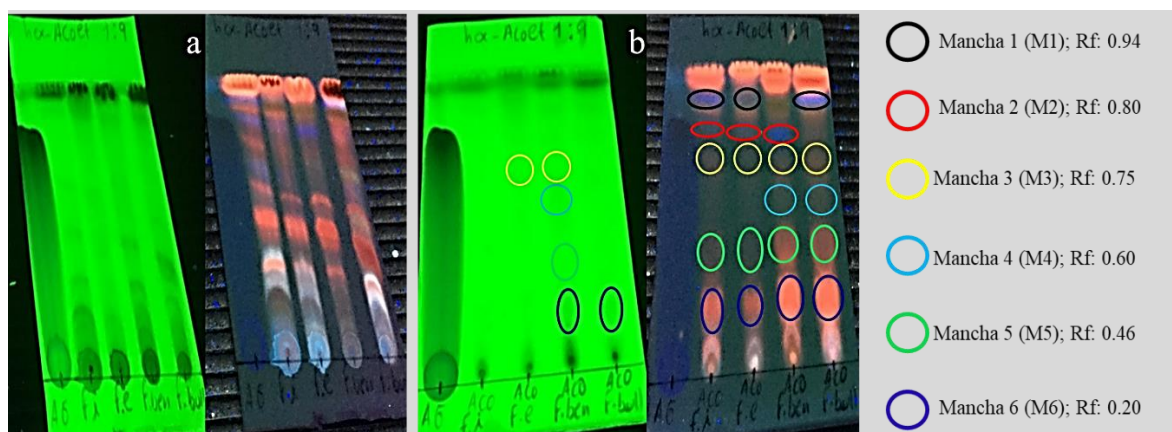


Figura 1.17 Cromatoplasmas de los subextractos acetato de etilo y extractos etanólicos foliares crudos, a) Placas de los extractos EtOH crudos, bajo luz UV a 300nm y 245 nm, b) Placas de los subextractos AcOEt, bajo luz UV a 300 nm y 245 nm y la indicación de compuestos de interés.

La complejidad de los extractos etanólicos foliares crudos es muy evidente bajo la luz UV a 245 nm (figura 1.18, a), gracias a que muchos fitoconstituyentes tienen la capacidad de absorber la luz ultravioleta, lo que se convierte en la presencia de manchas cromatográficas de diferentes colores, que corresponden a la diversidad de compuestos químicos presentes en la muestra vegetal analizada.

Por su parte, la cromatografía de capa delgada de los subextractos AcOEt (figura 1.18, b), revela una mezcla menos compleja de compuestos gracias a la partición realizada. En esta placa se destaca la presencia de algunas manchas o compuestos que resultan de interés para esta investigación. En la placa destacamos la presencia de 6 manchas, enumeradas del 1 al 6 (M1 a M6). Cada una de estas manchas podría corresponder a un compuesto o a la mezcla de varios compuestos con similitud en sus polaridades y en sus núcleos estructurales.

La mancha 1 (M1), indicada en círculos de color negro, y que se observa de color violeta, tiene un Rf de 0.94, está presente en los subextractos de AcOEt de las especies *F. insipida*, *F. elastica* y *F. bullenei*; siendo menos intensa en *F. elastica*, lo cual podría sugerir que se encuentra en menor concentración con respecto a los otros dos subextractos que la contiene. La mancha 2 (M2),

señalada con círculos de color rojo, y que también se observa de color violeta bajo la luz a 245 nm y tiene un Rf 0.80, está presente en los subextractos de las especies *F. insipida*, *F. elastica* y *F. benjamina*, siendo más intensa en esta última especie y mucho menos intensa en la segunda especie; además es posible observar que su valor de Rf es muy similar al del ácido gálico (AG), esto podría confirmar la naturaleza fenólica de estos compuestos, ya que este compuesto es uno de los ácido fenólicos presente en muchas plantas. Las manchas 1 y 2 son poco visibles en las placas bajo la luz a 300 nm.

La mancha 3 (M3), encerrada en un círculo de color amarillo, está presente en todos los subextractos de AcOEt, presenta un Rf de 0.75 y se observa con una coloración rosa claro o salmón, y con poca intensidad bajo la luz a 300 nm, esta baja intensidad puede estar relacionada a la presencia de este compuesto en los subextractos de AcOEt de las cuatro especies pero en una concentración baja. Al mirar la placa bajo la luz a 245 nm (figura 1.18, b), es posible observarlas de manera casi imperceptibles. La mancha 4 (M4), encerrada en un círculo de color azul, está presente solo en dos de los subextractos, en *F. benjamina* y *F. bullenei*, presenta un Rf de 0.60 y se observa con una coloración rosa claro o salmón, y con baja intensidad bajo la luz a 300 nm. Al mirar la placa bajo la luz a 245 nm (figura 1.18, b), es posible observarlas de manera casi imperceptibles al igual que las otras manchas.

La mancha 5 (M5), encerrada en círculos de color verde, y un valor de Rf de 0.46, podría considerarse como una sola mancha o dos manchas muy cercanas y con poca definición entre ellas; está presente en todos los subextractos de AcOEt, y se observa con mayor intensidad en *F. benjamina* y *F. bullenei* y con menor intensidad para las especies *F. insipida* y *F. elastica* observadas bajo la luz UV a 254 y 300 nm; y de igual manera, podría considerarse que está en una concentración mayor en las dos primeras especies mencionadas.

La última mancha consideradas es la 6 (M6), encerrada en un círculo de color morado, de coloraciones intensas en las cuatro especies, especialmente para *F. benjamina* y *F. bullenei*, vistas bajo ambas longitudes de ondas. Esta mancha tiene un Rf de 0.20 y puede considerarse como los compuestos más polares de los seis considerados. La polaridad en los flavonoides aumenta con el número de grupos hidroxilos (OH) sobre los anillos, así como con la presencia de azúcares unidos

a sus estructuras, mediante enlaces O-glicosídicos, los cuales son los más comunes en este tipo de compuestos (Pawlak *et al.*, 2010).

En la tabla 1.7, se resumen los datos obtenidos por CCD de los subextractos de AcOEt, los valores Rf de cada mancha cromatográfica, la presencia o ausencia de compuestos entre las especies evaluadas, representados como muy intensa (+++), moderada (++) , tenue (+) y ausente (-).

Tabla 1.7 Resumen de datos obtenidos por CCD de los subextractos AcOEt.

Datos CCD subextractos AcOEt		Especies			
Manchas	Valor Rf	<i>F. insipida</i>	<i>F. elastica</i>	<i>F. benjamina</i>	<i>F. bullenei</i>
M1	0.94	+++	++	-	+++
M2	0.80	+	+	+++	-
M3	0.46	+	+	+++	+++
M4	0.60	-	-	+++	+++
M5	0.75	++	+	+	++
M6	0.20	++	++	+++	+++

Los subextractos de cada especie fueron sometidos a cromatografía en columna, usando sistemas de elución hexano-Acetato de etilo 1:1, aumentando la polaridad hasta el sistema diclorometano-metanol 9:1. La recolección de las fracciones obtenidas se monitoreó por cromatografía de capa delgada (CCD), usando ácido gálico y subextractos de acetato de etilo de cada especie como referencia, como se muestra en el ejemplo de la figura 1.19, con la finalidad de intentar separar cada una de las manchas o hacer menos compleja la mezcla de estas, y así poder ser analizados por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), indicada para evaluar compuestos fenólicos como flavonoides, permitiendo identificar diferencias y similitudes en sus núcleos estructurales, condiciones claves para proponer este tipo de metabolitos secundarios como criterio quimiotaxonómico.

En la tabla 1.8 se presentan las fracciones obtenidas, sus pesos y el porcentaje de rendimiento de los subextractos (AcOEt) para cada especie.

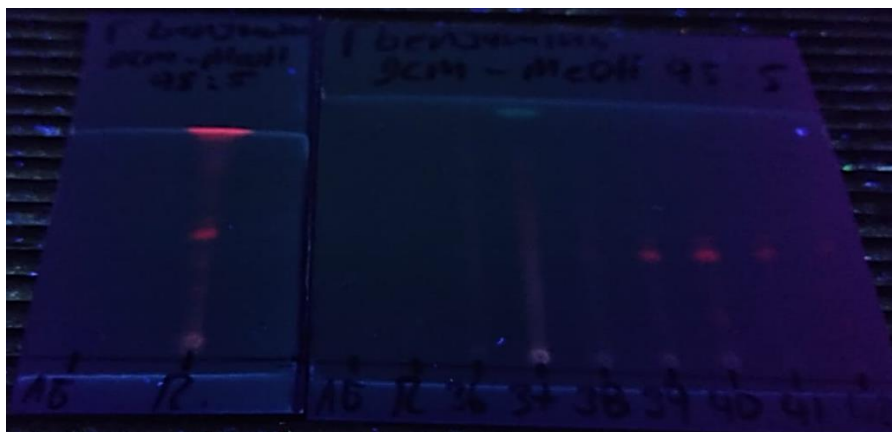


Figura 1.18 Monitoreo por CCD de la recolección de fracciones del subextracto AcOEt de *F. benjamina*, obtenidas por CC.

Tabla 1.8 Fracciones obtenidas de los subextractos acetato de etilo de cada especie

Especies	Peso de subextractos (mg)	Fracciones	Peso de fracciones (mg)
<i>F. insipida</i>	145	F1	23
		F2	17
		F3	14
		F4	18
		F5	4
<i>F. benjamina</i>	160	F1	5
		F2	19
<i>F. elastica</i>	125	F1	15
		F2	7
		F3	11
<i>F. bullenei</i>	200	F1	6
		F2	8
		F3	15
		F4	7
		F5	3

1.6. Conclusiones parciales.

El análisis fitoquímico indica la presencia de metabolitos secundarios tipo flavonoides, terpenos y/o esteroides, y la ausencia de alcaloides en los extractos etanólicos foliares de las especies *Ficus insipida*, *Ficus benjamina*, *Ficus elastica* y *Ficus bullenei*.

El perfil cromatográfico obtenido al realizar cromatografía en capa delgada a los subextractos acetato de etilo de las especies *F. insipida*, *F. benjamina*, *F. elastica* y *F. bullenei*, reveló diferencias entre la constitución de la mezcla de compuestos, ya que no todas las seis manchas seleccionadas son comunes en las cuatro especies, y aquellas que lo son, puede que no están presentes en la misma concentración. Esta información, complementada con el análisis por HPLC resultaría muy útil para determinar y caracterizar estructuralmente estos fitoconstituyentes, claves para comparaciones biológicas (taxonómicas).

1.7. Recomendaciones.

Para el tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos foliares de las especies de estudio, se recomienda realizar los ensayos de fenoles totales (Foulin-Ciocalteu) y composición de flavonoides totales (TFC), con el fin de determinar la cantidad de fenoles presentes en cada extracto y obtener un análisis minucioso de los marcadores químicos o quimiotipos investigados (Flavonoides).

Es importante conocer la estructura de los compuestos evaluados, en este caso, flavonoides, para ello se recomienda aplicar técnicas sofisticadas para el análisis y elucidación de estructuras de estos compuestos, la técnica indicada para este tipo de investigación es: Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), siendo esta la más recomendada para analizar flavonoides, bajo condiciones de trabajo controladas y programadas.

Aplicar el método comparativo una vez elucidadas las estructuras de los quimiotipos, determinar las diferencias y similitudes de las estructuras de los flavonoides entre la especies investigadas, esto es clave para el completo término de esta investigación, de esta manera se logrará demostrar la importancia de las herramientas químicas aplicadas a controversias e inconvenientes taxonómicos en especies vegetales

**2. CAPITULO 2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS
EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO *Ficus*
L. (MORACEAE) RECOLECTADAS EN PLANETA RICA, (CÓRDOBA-COLOMBIA).**

2.1. Introducción

El uso tradicional de plantas medicinales es ampliamente reconocido en la mayoría de los países, donde muchas especies vegetales se utilizan en el tratamiento de diversas afectaciones de salud. Soportado por el conocimiento etnobotánico de la medicina tradicional que ha trascendido en las generaciones. La naturaleza proporciona gran variedad de especies vegetales que contienen metabolitos secundarios, estos, presentan muchas propiedades biológicas, por ejemplo, varias especies del género *Ficus* son reconocidas en la medicina tradicional de todo el mundo, por sus propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes; por actividades biológicas como antibacteriana, cardioprotector y antioxidante (Gupta & Jain, 2010; Nworu *et al.*, 2013; Mittal *et al.*, 2013; Salvi *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013; Giraldo *et al.*, 2015, como se cita en García-Alvarado, 2015).

Las propiedades antioxidantes son esenciales en el organismo, a pesar de la fuerte actividad antioxidante de sus enzimas, el cuerpo depende del suministro adecuado de antioxidantes exógenos y cofactores utilizados en las reacciones enzimáticas. Los antioxidantes exógenos más conocidos, obtenidos de los alimentos, incluyen la vitamina C (ácido ascórbico), β -caroteno (provitamina A), vitamina A (retinol), vitamina E (tocoferol), glutatión y compuestos polifenólicos, estos son capaces de neutralizar los efectos nocivos de los radicales libres, su suplementación puede ser útil en la prevención y el tratamiento de enfermedades originadas por radicales libres. Existe evidencia de que una dieta rica en productos vegetales, hierbas y especias con un alto potencial antioxidante, contribuye a la homeostasis en el cuerpo y reduce el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Bartosz, 2003; Benzie & Siu-Wai, 2014, como se cita en Jakubczyk *et al.*, 2020).

Como resultado de los procesos del metabolismo celular, se originan moléculas denominadas radicales libres, las cuales, a su vez, pueden ser especies reactivas de oxígeno (EROS) o especies reactivas de nitrógeno (ERN). Se considera radical libre (RL) o especie reactiva de oxígeno (EROS) aquella molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad, estos atacan componentes celulares, causando con ello daño sobre biomoléculas como lípidos, proteínas, además, afectando ácidos nucleicos como el ADN lo cual induce al inicio patológico de muchas

enfermedades, entre las que se encuentran distintos tipos de cáncer, problemas cardíacos y vasculares, diabetes y desórdenes neurovegetativos (Céspedes & Sánchez, 2000; Fang *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2007, como se cita en Quiroz-Lobo, 2019).

La búsqueda de estrategias para contrarrestar los daños por exceso de radicales libres, ha direccionado las investigaciones hacia muchas especies vegetales, con el fin de encontrar compuestos antioxidantes de origen natural, siendo los flavonoides y polifenoles los más estudiados. Las especies del género *Ficus* presentan los metabolitos secundarios antes mencionados, a partir de la información etnobotánica se han realizado varios estudios fitoquímicos donde correlacionan la capacidad antioxidante y la presencia de compuestos fenólicos. Hay un creciente interés por encontrar fuentes naturales de antioxidantes, para introducirlos en nuestra dieta o generar medicamentos de origen natural debido al rol que desempeñan en la prevención de algunas enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Anandjiwala *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013).

2.2. Objetivos

2.2.1. General.

Evaluar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos foliares de las especies *Ficus benjamina*, *Ficus insipida*, *Ficus elastica* y *Ficus bullenei*, recolectadas en Planeta Rica, Córdoba.

2.2.2. Específicos.

- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos foliares de las especies *Ficus benjamina*, *Ficus insipida*, *Ficus elastica* y *Ficus bullenei* para los radicales DPPH•, ABTS^{•+} y FRAP.
- Calcular el IC₅₀ de los extractos etanólicos foliares de las especies *Ficus benjamina*, *Ficus insipida*, *Ficus elastica* y *Ficus bullenei* frente a los radicales DPPH• y ABTS^{•+}.
- Comparar la capacidad antioxidante entre las especies de estudio.

2.3. Estado de arte

2.3.1. Marco referencial.

Ginting y colaboradores (2020), evaluaron la actividad antioxidante del extracto etanólico foliar de la especie *Ficus elastica* Roxb. Ex Hornem, en Indonesia, empleando los métodos espectrofotométricos DPPH•, ABTS^{•+}, FRAP y Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) , obteniendo valores IC₅₀ de 13.82 µg/mL, 23.29 g/mL, 241.58 µM Fe(II)/µg y 83.97 µg/mL, concluyendo que el extracto etanolico foliar de *Ficus elastica* y los compuestos puros (quercitrina, micricitrina, morina y eleuterósido B) tienen potencial como agentes antioxidantes.

Nurviana, Tuslinah, & Susanti (2020), evaluaron la actividad antioxidante del extracto metanolico foliar de *Ficus elastica*, en indonesia, mediante el método DPPH•, Los resultados muestran que el extracto metanólico foliar de *Ficus elastica*, tiene un potencial antioxidante muy alto con un valor IC₅₀ de 7,6906 ± 0,3 mg/L, en comparación con el valor IC₅₀ del compuesto estándar (ácido ascórbico) de 5.6109 ± 0,5 mg/L.

Saptarini & Herawati (2015), en Indonesia, compararon la actividad antioxidante de extractos y fracciones foliares de *Ficus benjamina* y *Annona reticulata*, mediante el metodo DPPH•. Los resultados indican valores IC₅₀ para *Ficus benjamina* de 127.86 ppm para el extracto etanólico, 94.01 ppm para la fracción acuosa, 115.48 ppm para la fracción de acetato de etilo y 335.50 ppm para la fraccion de n-hexano. Los valores IC₅₀ para *Annona reticulata* fueron: 274.31 ppm para el extracto etanólico, 211.42 ppm para la fracción acuosa, 367.91 ppm para la fracción de acetato de etilo y 741.08 ppm para la fracción n-hexano. Concluyendo que la fracción acuosa de *Ficus benjamina* presentó la mejor actividad antioxidante en comparación con cualquier otro extracto o fracción.

Kanaujia y colaboradores (2012), evaluaron la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del extracto etanólico foliar de la especie *Ficus benjamina* L, en India. La actividad antioxidante *in vitro* se evaluó mediante los métodos DPPH• y óxido nítrico, los valores IC₅₀ calculados fueron: 120.0, 85.0, 75.0 µg/ml y 135.0, 80.0, 65.0 µg/ml respectivamente, comparado con el estándar ácido ascórbico. El ensayo *in vivo* se realizó utilizando el modelo de hepatotoxicidad inducida por CCl₄ en ratas Wistar albino, el extracto y los compuestos aislados mostraron un aumento significativo en los niveles de glutatión y enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasa, a diferentes niveles de dosis. Concluyendo que el extracto foliar de *Ficus benjamina* L; presenta fuerte actividad antioxidante en diferentes sistemas, *in vitro* e *in vivo*.

2.3.2. Marco teórico

2.3.2.1 Estrés oxidativo.

El oxígeno es un elemento que presenta un perfil con doble efecto fisiológico; es esencial para el desarrollo de la vida aerobia y posee efectos tóxicos inherentes a su estructura. Del oxígeno se derivan moléculas inestables denominadas radicales libres (RL) que pueden causar daño a nivel celular, cuando se pierde el equilibrio entre dichas moléculas y el sistema de defensa antioxidante que poseen los seres vivos, generando así, daños y modificaciones en biomoléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos e incluso en ácidos nucleicos (Corrales & Muñoz Ariza, 2012), induciendo al estrés oxidativo celular, como se muestra en la figura 2.1. Este mecanismo se relaciona con el desarrollo y evolución de una gran variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes. Su estudio se ha centrado en el conocimiento de los mecanismos de su génesis y las formas de atenuar, disminuir y contrarrestarlas, por medio de sistemas de defensa antioxidante que posee la célula y la forma de controlar los RL que se generan de forma normal y continua en el organismo, resultado de algunos procesos celulares como el relacionado con el metabolismo oxidativo de la mitocondria, proceso necesario para la obtención de energía (Corrales & Muñoz Ariza, 2012).



Figura 2.1 Efectos nocivos de los radicales libres. Fuente (Gulcin, 2020).

Las EROS se generan en muchas células bajo condiciones fisiológicas y el organismo utiliza mecanismos potentes de defensa para evitar la acumulación de las EROS, tanto a nivel fisiológico como bioquímico. Entre ellos se destacan, a nivel fisiológico, el sistema microvascular, cuya función es mantener los niveles de O_2 en los tejidos y a nivel bioquímico, la defensa antioxidante puede ser enzimática o no enzimática, (Lee *et al.*, 2012).

2.3.2.2. Actividad antioxidante.

Un antioxidante es una molécula que ralentiza o previene la oxidación de biomoléculas como lípidos, proteínas e incluso ácidos nucleicos, desempeñando un papel vital en el cuerpo humano, reduciendo los procesos oxidativos y los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gocer *et al.*, 2013; Cakmakci *et al.*, 2015, citados en Gulcin, 2020).

Las técnicas desarrolladas para medir la capacidad antioxidante de muestras biológicas valoran la habilidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes en el fluido o célula, para reducir las especies oxidantes introducidas (iniciador) en el sistema de ensayo, por lo que son, en general, clasificados como métodos de inhibición directos o indirectos del poder oxidante de una molécula estándar determinada que es el iniciador (Quintanar & Calderón, 2009).

La actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. En dicha medición de una muestra oxidante, pueden usarse intermediarios o productos finales para valorar la actividad antioxidante. Pero la actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose solo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test in vitro para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que los modelos presenten diferentes variaciones que puede dificultar un poco la comparación de los resultados entre un método y otro. Con base a las reacciones químicas, la gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías: Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET) los cuales se presentan en la tabla 2.1 (Huang *et al.*, 2005, como se cita en De la Ossa, 2017).

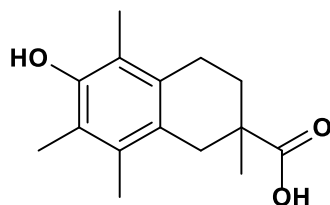
Tabla 2.1 Clasificación de los modelos de ensayo *in vitro* según su modo de reacción ET o HAT.

Ensayos	Categorías
<ul style="list-style-type: none">➤ Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenztiazolina-6-sulfónico) ABTS.➤ 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, DPPH.➤ Potencia antioxidante de reducción férrica FRAP.➤ N,N- Dimetil-p-fenilendiamina, DMPD.➤ Capacidad antioxidante reductora de cobre, CUPRAC.➤ Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, ORAC.	Ensayos basados en la transferencia de electrones (ET).
<ul style="list-style-type: none">➤ Parámetro antioxidante de captura de radicales, TRAP.➤ Inhibición de la oxidación del ácido linoleico.➤ Inhibición de la oxidación de los lípidos de baja densidad, LDL.	Ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrogeno (HAT)

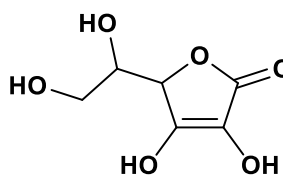
Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) involucran una reacción Redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. La mayoría de los ensayos basados en HAT monitorean una reacción cinética competitiva, generalmente están compuestos de un generador de radical libre sintético, una prueba molecular oxidable y un antioxidante. Los ensayos basados en HAT y ET fueron desarrollados para medir la capacidad de atrapar radicales libres, en lugar de la capacidad preventiva antioxidante de una muestra (Huang *et al.*, 2005).

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante total se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o de la muestra. Por otra parte, existen ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en el tiempo de evaluación, en la técnica instrumental utilizada, la sensibilidad y en las interacciones de la muestra con el medio de reacción (Quintanar & Calderón, 2009) en estos tipos de métodos se utilizan como referentes trolox o ácido ascórbico, estos han

demostrado efecto protector contra una variedad de enfermedades como cáncer de esófago, úlcera estomacal y duodenal, infertilidad masculina y daño oxidativo inducido por endotoxinas.

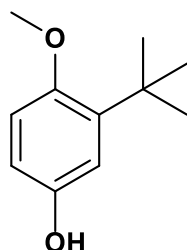


Trolox

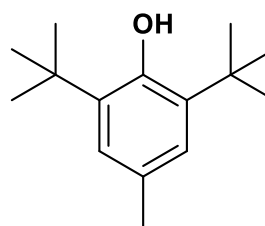


Ácido ascórbico

Por otra parte, el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT) son los antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria de alimentos y farmacéutica; sin embargo, se han encontrado efectos secundarios en humanos, como el aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, entre otras. Debido a estos efectos y a la creciente importancia de los antioxidantes en la industria farmacéutica y alimenticia es necesaria la búsqueda de moléculas alternativas de origen natural con gran actividad, que no tengan efectos citotóxicos y genotóxicos (Rojano *et al.*, 2008, como se cita en Guzmán, 2014).



Butilhidroxianisol



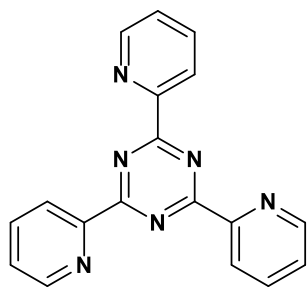
Butilhidroxitolueno

Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH• es el más rápido, es simple y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otra parte, el ensayo de decoloración ABTS+• se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Por lo tanto, estos dos métodos son los más usados (Bristi *et al.*, 2013).

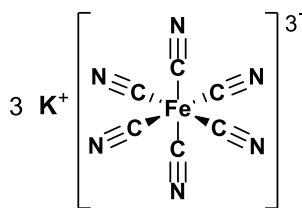
Otro método para determinar de forma indirecta la actividad antioxidantes es por el potencial de reducción férrica (FRAP). El hierro tiene varias funciones en el cuerpo que se relacionan con el metabolismo del oxígeno y especialmente en el transporte de éste por la hemoglobina. Dentro del cuerpo el hierro existe en dos estados de oxidación: ferroso (Fe^{2+}) o férrico (Fe^{3+}). Bajo condiciones

de pH neutro o alcalino, el hierro se encuentra en su estado Fe^{3+} y en un pH ácido el estado de Fe^{2+} es favorecido. Cuando el hierro se encuentra en su estado Fe^{3+} forma grandes complejos con aniones de agua y peróxido. Estos complejos tienen poca solubilidad y su agregación lleva a consecuencias patológicas. El ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP), se basa en la reducción de un complejo Fe^{3+} - TPTZ incoloro en Fe^{2+} - TPTZ azul intenso, con un máximo de absorción a 593 nm, una vez que interactúa con un antioxidante potencial. Otras metodologías utilizan como agente complejante del Fe^{3+} , el ferrocianuro de potasio (HCFP, por sus siglas en inglés) que forma complejos estables con la forma férrica a pH relativamente neutros, este complejo puede ser reducido a la forma ferrosa formando una coloración azul que tiene un máximo de absorbancia a 700 nm (Guzmán, 2014).

Este método demostró ser útil para el análisis de las capacidades antioxidantes y la comparación de la eficiencia de diferentes compuestos. Por lo tanto, el método FRAP es clave para investigaciones de actividad antioxidante. Curiosamente, el mecanismo exacto de la actividad antioxidante de estos compuestos, y la influencia de la estructura de los compuestos en su actividad, todavía no está completamente aclarado y es controvertido en la literatura (Chen *et al.*, 2015; Amorati & Valgimigli, 2012, como se cita en Spiegel *et al.*, 2020).



Tripiridiltriazina



Ferrocianuro de Potasio

2.3.2.3. Sistema de defensa antioxidante.

Las células están protegidas contra el estrés oxidativo mediante una red interactiva de enzimas antioxidantes. Aquí, el superóxido liberado por procesos como la fosforilación oxidativa se convierte inicialmente en peróxido de hidrógeno y luego se reduce para transformarse en agua.

Esta vía de desintoxicación es el resultado de múltiples enzimas, con superóxido dismutasa, catalizando el primer paso y luego las catalasas y varias peroxidasas que eliminan el peróxido de hidrógeno (Lobo *et al.*, 2010).

➤ Sistema de defensa enzimático

Las superóxido dismutasas son una clase de enzimas estrechamente relacionadas, que catalizan la descomposición del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Estas enzimas están presentes en casi todas las células aeróbicas y en los fluidos extracelulares (Zelko *et al.*, 2002; Johnson & Giulivi, 2005). Hay tres familias principales de superóxido dismutasa, dependiendo del cofactor metálico: Cu / Zn (que une tanto al cobre como al zinc), los tipos Fe y Mn (que se unen al hierro o al manganeso) y, finalmente, el tipo Ni, que une al níquel (Wuerges *et al.*, 2004). En los seres humanos (como en todos los demás mamíferos y la mayoría de los cordados), están presentes tres formas de superóxido dismutasa. La SOD1 se encuentra en el citoplasma, la SOD2 en las mitocondrias y la SOD3 es extracelular. El primero es un dímero (consta de dos unidades), mientras que los otros son tetrámeros (cuatro subunidades). SOD1 y SOD3 contienen cobre y zinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro reactivo (Cao *et al.*, 2008, como se cita en Lobo *et al.*, 2010).

La catalasa es una de las enzimas antioxidantes más importantes en el sistema de defensa antioxidante endógeno, se encuentra presente en la mayoría de organismos aeróbicos; adquiere su efecto antioxidante al descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), subproducto nocivo de muchos procesos metabólicos normales, en moléculas de oxígeno y agua, las cuales son menos reactivas (Nandi *et al.*, 2019).

La glutatión peroxidasa es una enzima intracelular importante que descompone los peróxidos de hidrógeno (H_2O_2) en agua; y transforma los peróxidos de lípidos a sus correspondientes alcoholes, principalmente en las mitocondrias y algunas veces en el citosol. La mayoría de las veces, su actividad depende de un cofactor de micronutriente conocido como selenio. Por esta razón, se le denomina peroxidasa selenocisteína. La enzima juega un papel más crucial en la

inhibición del proceso de peroxidación lipídica y, por lo tanto, protege a las células del estrés oxidativo (Gill & Tuteja, 2010, como se cita en ghodaro & Akinloye, 2017).

➤ Sistema de defensa no enzimático

El ácido ascórbico o "vitamina C", es un cofactor enzimático y antioxidante hidrosoluble producido por plantas, algunos animales y no sintetizado en humanos; se trata de un micronutriente antioxidante esencial con un potente efecto reductor, que desempeña un rol fundamental en numerosos procesos fisiológicos del cuerpo humano, ayudando en la síntesis y metabolismo de otras vitaminas y aminoácidos requeridos por el cuerpo como por ejemplo la tirosina, ácido fólico, lisina y triptófano. Además aumentar la absorción de hierro por parte del cuerpo al reducir el ion férrico a estado ferroso (Chambial *et al.*, 2013; Caritá *et al.*, 2020, como se cita en Attia *et al.*, 2020).

La vitamina E se encuentra en estado natural como β - γ - y δ -tocoferoles, principalmente en aceites vegetales y en forma de suplemento como alfa tocoferol. Los tocoferoles y tocotrienoles constituyen un grupo de sustancias finalizadoras de reacciones en cadena de la peroxidación lipídica. Los tocoferoles son de naturaleza lipofílica y se encuentran asociados con lipoproteínas, depósitos de grasa y membranas celulares, protegiendo los ácidos grasos poliinsaturados de la peroxidación, por su parte, los tocotrienoles penetran y actúan en los tejidos con capas de grasa saturadas como el cerebro y el hígado (Ahsan *et al.*, 2014; Khadangi & Azzi, 2019, como se cita en Chiuman & Sutanto, 2020).

2.4. Materiales y métodos.

Para la evaluación de la actividad antioxidante, se utilizaron pequeñas alícuotas preparadas a partir los extractos etanólicos foliares de las especies *F. insipida*, *F. benjamina*, *F. elastica* y *F. bullenei*, (Sección 1.5.1, del Capítulo I).

2.4.1. Ensayos de actividad antioxidante.

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó frente a los radicales 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH.) y Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico) (ABTS⁺), por su parte, la evaluación del potencial de reducción férrica (FRAP) se llevó a cabo frente al complejo 2, 4, 6-Tri (2-piridil)-1, 3, 5-triazina (TPTZ).

2.4.2. Preparación y activación de los radicales DPPH. y ABTS⁺.

Para preparar la solución madre de DPPH. se disolvieron 150 mg DPPH. en 7 mL metanol y se guardaron en la oscuridad por 24 h. Pasado este tiempo se tomaron pequeñas alícuotas de 1 ml aproximadamente, las cuales se diluyeron con metanol hasta obtener una absorbancia ajustada de 0.300 ± 0.05 a una $\lambda = 517$ nm en un espectrofotómetro, calibrado con un blanco de metanol.

Por su parte, la solución madre del catión radical ABTS⁺ (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) se preparó tomando 17.5 mg de ABTS⁺, los cuales se disolvieron en 9.9 ml de H₂O estéril. Luego se tomaron 34 mg de persulfato de potasio (S₂O₈K₂) disueltos en 1 mL de H₂O. De estas soluciones preparadas se tomaron 9.9 ml de solución de ABTS⁺ (3.5 mM) y 0.1 ml de solución de persulfato de potasio (125 mM) y se mezclaron. Posteriormente se guardaron en la oscuridad por 12 h. Pasado este tiempo se tomaron pequeñas alícuotas y se diluyeron con un buffer fosfato a pH 7.4, hasta obtener una absorbancia ajustada de 0.700 ± 0.05 a una $\lambda = 732$ nm en el espectrofotómetro, calibrado con un blanco de buffer fosfato.

2.4.3. Determinación de la actividad antioxidante, métodos DPPH•, ABTS^{•+} y FRAP.

Para la estimación de la actividad antioxidante por los métodos ABTS^{•+} y DPPH•, se prepararon soluciones de los extractos a una concentración inicial de 20.000 mg/L, diluyendo 40 mg de cada extracto etanólico foliar en 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO); a partir de esta, se prepararon por dilución soluciones intermedias a una concentración de 100 mg/L (2.5 ml por cada extracto), diluyendo 125 µL de la solución inicial en 2.375 µL de (DMSO). A continuación se prepararon por dilución las soluciones de trabajo de cada extracto, en un rango de concentraciones (de 1 a 6 mg/L).

Se calcularon los volúmenes de las soluciones de los extractos para cada concentración de trabajo, a partir de la solución intermedia a 100 mg/L, las cuales se adicionaron a los tubos de ensayo previamente rotulados y se completó un volumen total de 2 ml para cada tubo; donde los tubos de reacción contienen solución del extracto + radical, los tubos del blanco contienen solución del extracto + metanol, para el método DPPH•; mientras que para el ensayo ABTS^{•+} se adicionó solución del extracto + buffer fosfato a pH: 7.4, finalmente en los tubos de referencia se adicionó radical + DMSO, para el método DPPH• y radical + buffer fosfato a pH: 7.4, para el ensayo ABTS^{•+}. Una vez preparados todos los tubos a evaluar (reacción, blanco y referencia, todos por triplicado) se guardaron en la oscuridad durante 40 minutos. Después de este tiempo se realizaron las lecturas de absorbancias en un espectrómetro de UV-V GENESYS 20, bajo longitudes de onda ajustadas para cada método (517nm para DPPH• y 734nm para ABTS^{•+}).

Todas las lecturas se realizaron por triplicado, posteriormente se calcularon los porcentajes de inhibición (%Inh) para los ensayos descritos, mediante la ecuación 1. Al graficar los (%Inh) en función de las concentraciones de trabajo para cada extracto y por medio de interpolación gráfica, se obtuvieron los valores inhibitorios medios (IC₅₀) para cada ensayo.

$$\%inh = [1 - (\frac{A. muestra - A. blanco}{A. referencia})] * 100$$

Ecuación 1 Cálculo del porcentaje de inhibición.

Donde se evaluaron los siguientes datos por el método DPPH.

A muestra = Es la absorbancia de la muestra (solución del extracto + radical)

A blanco = Es la absorbancia del blanco (solución del extracto + metanol)

A referencia = Absorbancia de referencia (radical + solvente de la muestra).

Mientras que para el ensayo con el catión radical ABTS^{•+} se evaluó:

A muestra = Es la absorbancia de la muestra (solución del extracto + radical)

A blanco = Es la absorbancia del blanco (solución del extracto + buffer fosfato pH: 7.4)

A referencia = Absorbancia de referencia (radical + buffer fosfato pH: 7.4).

Para el método FRAP, se realizó preparación de la solución madre de TPTZ, mezclando 25 mL de solución buffer de acetato 300 mM; pH 3.6, con 2.5 mL de solución de TPTZ 10 mM (0.083 g de TPTZ aforados a 10 mL) en HCl 40 mM (1.7 mL de HCl aforados en 500 mL de H₂O) y 2.5 mL de FeCl₃·6H₂O 20 mM (0.540 g de FeCl₃·6H₂O aforados a 100 mL de H₂O).

Para la evaluación del potencial de reducción férrica se mezclaron 900 µL de solución madre de TPTZ previamente preparada, con 50 µL de muestra en H₂O (a Concentraciones finales de 2, 3, 4, 5 y 6 mg/L) y 50 µL de agua destilada. Luego se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 60 min y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro, usando agua destilada para ajustar el blanco del equipo. Para cada muestra se tuvo en cuenta la lectura de la absorbancia del blanco que no contenía TPTZ y se utilizó ácido gálico como patrón de referencia. Todas las lecturas se realizaron por triplicado y se graficó la absorbancia en función de las concentraciones de muestra, para observar la cantidad de Fe²⁺ formado a en la reacción a diferentes concentraciones de muestra.

2.4.4. **Análisis estadístico.**

En la evaluación de la actividad antioxidante, los experimentos se hicieron bajo un diseño completamente al azar. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los datos obtenidos fueron analizados por la pruebas de normalidad Shapiro-Wilks, ANOVA de un factor, con $\alpha=0.05$ de confianza y una prueba de múltiples rangos LSD (Fisher). Para esto se empleó el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión versión XVI. Para el desarrollo del análisis estadístico de los datos se plantearon las respectivas hipótesis estadísticas para el ANOVA de un factor.

Las hipótesis propuestas para el análisis de varianzas de un factor fueron:

H_0 = el valor del porcentaje de inhibición no se afecta significativamente por la variación en las concentraciones del rango de trabajo para cada tratamiento.

H_i = el valor del porcentaje de inhibición sí se afecta significativamente por la variación de las concentraciones del rango de trabajo para cada tratamiento.

2.5. **Resultados y discusión.**

2.5.1. **Actividad antioxidante.**

Se realizó un ensayo preliminar en las pruebas ABTS⁺ y DPPH. para determinar el rango de concentraciones de trabajo, se observó que en el ensayo ABTS⁺ a 10 mg/L todos los extractos mostraron una inhibición del radical mayor de 90 %, y con el ensayo DPPH a una concentración de 20 mg/L, el porcentaje de inhibición de los extractos superaba el 80 %, por lo que se decidió trabajar con un rango de concentraciones entre 1 y 6 mg/L para todos los extractos.

Se evaluó las capacidad antioxidante de los extractos etanólicos foliares de las especies de estudio por los sistemas generadores de radicales ABTS⁺ y DPPH. a las concentraciones de trabajo determinadas mediante en el ensayo preliminar para cada método. Seguidamente se graficaron los datos de porcentaje de inhibición (%Inh) obtenidos de los extractos etanólicos foliares de las especies de estudio, frente a las concentraciones evaluadas de los mismos, luego se calculó el

porcentaje inhibitorio medio (IC_{50}) por interpolación gráfica, empleando el método de los mínimos cuadrados, como se muestra en la figura 2.2 para el método DPPH. y en la figura 2.3 para el ensayo ABTS⁺. Seguidamente se calcularon los valores IC_{50} en unidades (g/ml), empleando la conversión de la ecuación 2, para cada extracto; finalmente se expresaron como capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC, μmol de Trolox/g de muestra) mediante la ecuación 3, basados en el valor IC_{50} de la referencia (Trolox), Anexo 2.7, indicado en unidades ($\mu\text{mol}/\text{ml}$), mediante la conversión de la ecuación 4. Los resultados del ensayo DPPH. se muestran en la tabla 2.6 y los resultados del método ABTS⁺ se presentan en la tabla 2.7, respectivamente.

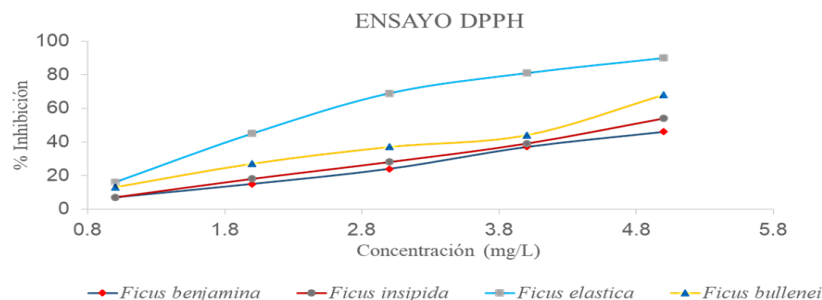


Figura 2.2 Gráfico de los porcentajes de inhibición (%Inh) versus las concentraciones de cada extracto etanólico foliar, por el método DPPH.

Tabla 2.2 Porcentaje de inhibición media (IC_{50}) método DPPH. y capacidad antioxidante expresada como equivalentes trolox (TEAC).

Extractos	IC_{50} método DPPH. (mg/L)	TEAC DPPH. ($\mu\text{mol}/\text{g}$)
<i>F. benjamina</i>	5.4	103.5
<i>F. insipida</i>	4.8	116.4
<i>F. elastica</i>	2.4	232.9
<i>F. bullenei</i>	3.9	143.3

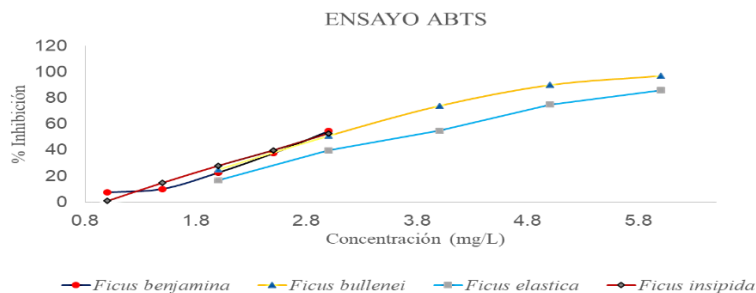


Figura 2.3 Gráfico de los porcentajes de inhibición (%Inh) versus las concentraciones de cada extracto etanólico foliar, por el método ABTS⁺⁺.

Tabla 2.3 Porcentaje de inhibición media (IC₅₀) método ABTS⁺⁺ y capacidad antioxidante expresada como equivalentes trolox (TEAC).

Extractos	IC ₅₀ método ABTS ⁺⁺ (mg/L)	TEAC ABTS ⁺⁺ (μmol/g)
<i>F. benjamina</i>	2.9	220.3
<i>F. insipida</i>	2.8	228.2
<i>F. elastica</i>	3.7	172.7
<i>F. bullenei</i>	3.0	213.0

$$\frac{IC_{50} \text{ del extracto } mg}{L} \times \frac{1 L}{1000 ml} \times \frac{1 g}{1000 mg}$$

Ecuación 2 Conversión de unidades para los IC₅₀ de los extractos, (mg/L) a (g/ml).

$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ Trolox } \left(\frac{\mu mol}{ml}\right)}{IC_{50} \text{ Muestra } \left(\frac{g}{ml}\right)}$$

Ecuación 3 Cálculo de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC).

$$\frac{IC_{50} \text{ Trolox } mg}{L} \times \frac{1 L}{1000 ml} \times \frac{1 g}{1000 mg} \times \frac{1 mol \text{ Trolox}}{250.29 g} \times \frac{1 \times 10^6 \mu mol}{1 mol}$$

Ecuación 4 Conversión de unidades para los IC₅₀ del Trolox, (mg/L) a (μmol/ml).

Para el método FRAP se determinaron las absorbancias de los extractos etanólicos foliares de las especies de estudio, las cuales estuvieron en un rango entre 0.6 a 1.5 nm; al compararlas con la absorbancia del ácido gálico (referencia), las cuales fueron de 1.6 a 2.5 nm, a las mismas concentraciones de trabajo (1, 2, 3, 4 y 5 mg/L). Se observa que todos los extractos etanólicos foliares presentan potencial de reducción en todas las concentraciones evaluadas, como se muestra en la figura 2.4.

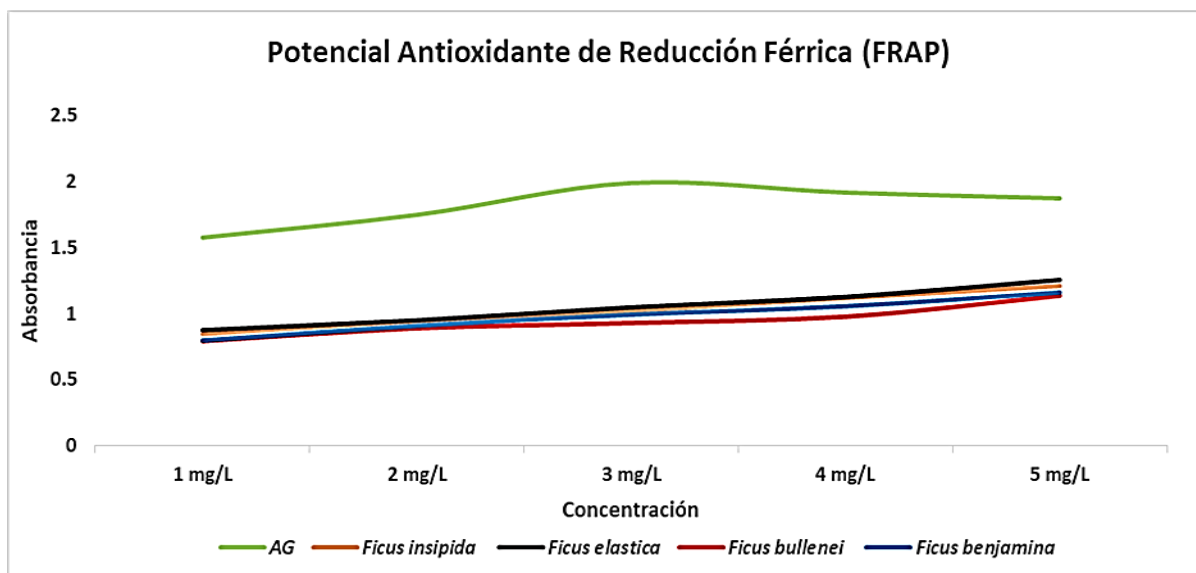


Figura 2.4 Gráfico de absorción vs concentraciones de los extractos y la referencia (Ac gálico) en el ensayo FRAP.

El género *Ficus* es reconocido a nivel mundial por estar relacionado con varias actividades biológicas, entre las cuales se destacan, actividades antihelmínticas, antibacterianas y antioxidante. En este estudio se indica la alta capacidad antioxidante que presentan los extractos etanólicos foliares de las especies *F. benamina*, *F. insipida*, *F. elastica* y *F. bullenei*, lo cual se relaciona directamente con la presencia de compuestos fenólicos como los flavonoides. Estos resultados concuerdan con los publicados por Sirisha y colaboradores (2010), donde informan que las especies del género *Ficus* contienen altos contenidos de polifenoles relacionadas con fuertes propiedades antioxidante. Así mismo, Kanaujia y colaboradores (2012) indican en su resultados que los extractos etanólicos foliares de *F. benamina* presentan alta capacidad antioxidante frente al sistema radicalario DPPH., cuyos valores IC_{50} calculados fueron 120.0, 85.0 y 75.0 mg/L, bajo condiciones específicas de trabajo; lo que concuerda con lo obtenido en este estudio para *F.*

benjamina, por el método DPPH., donde el valor IC₅₀ calculado fue de 5.4 mg/L y expresado en capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC), con un valor de 103.5 µmol/g, indicando la alta capacidad antioxidante que presenta esta especie.

Para la especie *F. elastica*, se obtuvieron valores IC₅₀ bajos en los ensayos ABTS⁺ y DPPH., los cuales fueron 3.7 mg/L y 2.4 mg/L, respectivamente y con valores TEAC de 172.2 y 232.9 µmol/g; estos valores indican gran capacidad antioxidante de los extractos etanólicos foliares de esta especie, lo cual concuerda con lo reportado por Ginting y colaboradores (2020), donde informan que el extracto etanolico foliar de *F. elastica* tiene potencial como agente antioxidante, demostrado con los valores IC₅₀ calculados para los metodo descritos, los cuales fueron 13.82 mg/L y 23.29 mg/L, respectivamente. Por su parte, Nurviana y colaboradores (2020) evaluaron la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos foliares de la especie *F. elastica*, medinate el metodo DPPH., indicando que el extracto metanólico foliar de la especie, tiene un potencial antioxidante muy alto, presentado con un valor IC₅₀ de 7,6906 ± 0,3 mg/L, comparado con la referencia ácido ascórbico empleada en su estudio.

Para la especie *F. insipida*, no se encontró información referente a la actividad antioxidante, sin embargo, se reportan resultados fitoquímicos, como los publicados por vejarano & Guerrero, (2011), indicando la presencia de compuestos fenólicos en los extractos foliares de esta especie, lo que concuerdan con los análisis fitoquímicos realizados en esta investigación, en este sentido, se puede correlacionar la capacidad antioxidante que presentó el extracto etanólico foliar de esta especie, frente a los sistemas radicalários ABTS⁺ y DPPH., cuyos valores IC₅₀ calculados, para los dos primeros ensayos, fueron 2.8 mg/L y 4.8 mg/L y expresados en TEAC con los valores 228.2 y 116.4 µmol/g, respectivamente.

Para la especie *F. bullenei*, no se encontró información referente a ensayos de actividad antioxidante, sin embargo, los análisis fitoquímicos realizados a esta especie, indicaron la presencia de compuestos fenólicos en los extractos etanólicos foliares, lo cual fundamenta la alta capacidad antioxidante que presentó esta especie frente a los sistemas radicalários ABTS⁺ y DPPH.; como lo indican los valores IC₅₀ calculados, los cuales fueron 3.0 y 3.9 mg/L y con valores TEAC de 213.0 y 143.3 µmol/g, respectivamente. Se evidencia la alta capacidad antioxidante de los extractos

de esta especie. Estos resultados son fundamentales para iniciar estudios fitoquímicos completos de la especie, así como investigaciones de actividades biológicas y otros ensayos de actividad antioxidante. Es fundamental el aporte de esta investigación al conocimiento de la especie, al ser uno de los primeros estudios en presentar análisis fitoquímicos, valor quimiotaxonómico de sus fitoconstituyentes (flavonoides) y actividad antioxidante de sus extractos etanólicos foliares.

Para el ensayo de potencial antioxidante de reducción férrica (FRAP), se concluye que todos los extractos etanólicos foliare presentaron potencial reductor, comparados con la sustancias de referencia ácido gálico, el cual es un polifenol conocido como fuerte agente antioxidante. Lo que concuerda con los resultados reportados por Sirisha y colaboradores (2010) para las especies *F. benjamina* y *F. elastica*. Por su parte Ginting y colaboradores (2020) reportan que los extractos etanólicos foliares de la especie *F. elastica* presentan potencial de reducción ferrica. Por su parte, se indica el potencial reductor de las especies *F. insipida* y *F. bullenei*, para estas ultimas especies, serían los primeros resultados de potencial antioxidante de reducción férrica presentados.

2.5.2. Análisis estadísticos.

Los datos obtenidos al evaluar la actividad antioxidante de los extractos etanólicos foliares de las especies *F. benjamina*, *F. insipida*, *F. elastica* y *F. bullenei*, mediante los ensayos de DPPH. y ABTS, se muestran en los Anexos 2.1 y 2.2 respectivamente. A partir de la realización de los análisis estadísticos de varianza ANOVA y la prueba de contraste de múltiples rangos LSD de Fisher ($p < 0.05$), para los datos de los ensayos de DPPH. y ABTS⁺, anexos 2.3 y 2.4, respectivamente. Se indica que los datos obtenidos del análisis de actividad antioxidante por los métodos descritos, presentan diferencias altamente significativas para cada extracto etanólico foliar evaluado, en la tabla 2.4 se presentan los valores obtenidos del ANOVA de un factor para el método DPPH. y en la tabla 2.5 para el ensayo ABTS⁺.

Como los p-valores son menores con respecto al nivel de significancia, se rechaza la hipótesis nula para los análisis de varianzas, concluyendo que los porcentajes de inhibición de cada método si se afectan de manera significativa por la variación de las concentraciones en el rango de trabajo para cada tratamiento. Por su parte, la prueba de contraste de múltiples rangos LSD de Fisher,

indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de trabajo en ambos ensayos, con un nivel de confianza del 95.0%, como se muestra en el Anexo 2.5 para el ensayo DPPH. y en el Anexo 2.6 para el ensayo ABTS⁺⁺, sin embargo, se observan algunos grupos homogéneos en las concentraciones 2-3 mg/L y 3-4 mg/L en los extractos etanólicos foliares de las especies *F. insipida* y *F. bullenei* en el método DPPH., en los cuales no existen diferencias estadísticamente significativas en los datos a estas concentraciones.

Por su parte, los análisis de varianza ANOVA y la prueba de contraste de múltiples rangos LSD de Fisher ($p < 0.005$) para el método FRAP, indicaron que los datos obtenidos no presentan diferencias significativas entre los extractos etanólicos foliares evaluados y las concentraciones de trabajo con un nivel de confianza del 95.0%, como se indica en el Anexo 2.8, indicando que los extractos etanólicos foliares evaluados presentan potencial antioxidante de reducción férrica similar, lo que concuerda con lo presentado en la figura 2.4.

Tabla 2.4 Resultados del análisis de varianzas método DPPH.

Extractos EtOH foliares	F-valor calculado	p-valor de la prueba
<i>F. benjamina</i>	180.172	0.000
<i>F. insipida</i>	19.0062	0.000
<i>F. elastica</i>	157.363	0.000
<i>F. bullenei</i>	27.5445	0.000

Tabla 2.5 Resultados del análisis de varianzas método ABTS⁺⁺.

Extractos EtOH foliares	F-valor calculado	p-valor de la prueba
<i>F. benjamina</i>	256.913	0.000
<i>F. insipida</i>	236.724	0.000
<i>F. elastica</i>	199.951	0.000
<i>F. bullenei</i>	285.346	0.000

2.6. Conclusión

Los ensayos de actividad antioxidante de los extractos evaluados presentaron buenos resultados frente a los sistemas radicaláricos ABTS⁺⁺, DPPH• y FRAP, siendo el extracto etanólico foliar de la especie *Ficus elastica* el más activo, estos datos son consistentes con base en resultados obtenidos de otras especies del mismo género, además estudios fitoquímicos en especies del género *Ficus* reportan la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides, lo cual, justifica el potencial antioxidante que presentan los extractos de las especies de estudio.

2.7. Recomendaciones.

Se recomienda realizar el ensayo de cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu) y la composición de flavonoides totales (TFC) (AlCl₃), con el fin de determinar la cantidad de fenoles y flavonoides presentes en cada extracto.

Se recomienda realizar otras pruebas de actividad antioxidante sobre los extractos etanólicos foliares de las especies investigadas, para contribuir con la búsqueda de sustancias biológicamente activas, de igual manera se recomienda profundizar los estudios fitoquímicos y realizar estudios de actividades biológicas en extractos de las especies *F. insipida* y *F. bullenei*, debido a que no se encuentra información referentes a las temáticas mencionadas, es por ello, que el aporte de esta investigación es clave para adelantar los estudios anteriormente mencionados para estas especies.

Continuar con el estudio de los extractos etanólicos foliares de las especies investigadas, con la finalidad de profundizar en la búsqueda de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antioxidante que presentan estas especies del género *Ficus*.

2.8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahsan, H., Ahad, A., Iqbal, J., & Siddiqui, W. A. (2014). Pharmacological potential of tocotrienols: a review. *Nutrition & metabolism*, 11-52.
- Aleixandre-Tudo, J.L., & du Toit, W. (2019). The Role of UV-Visible Spectroscopy for Phenolic Compounds Quantification in Winemaking. DOI:<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79550>.
- Aldana, D. (2007). Detección y cuantificación de flavonoides en *Polypodium triseriale* Swartz, *Phlebodium decumanum* (Willd.) J. Sm. y *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger: tres especies de calahuala nativas de Guatemala.
- Al-Rubaye, A., Hameed, H., & Kadhim, M. (2017). A Review: Uses of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Technique for Analysis of Bioactive Natural Compounds of Some Plants. *Int. J. Pharmacol. Res*, 81- 85.
- Al-Snafi, A. (2017). Pharmacology of *Ficus religiosa*- A review. *IOSR J. Pharm*, 49-60.
- Amorati, R., & Valgimigli, L. (2012). Modulation of the antioxidant activity of phenols by non-covalent interactions. *Org. Biomol. Chem.*, 4147–4158.
- Anandjiwala, S., Bagul, M. S., Parabia, M., & Rajani, M. (2008). Evaluation of Free Radical Scavenging Activity of an Ayurvedic Formulation, Panchvalkala. *Indian J. Pharm. Sci*, 31–35.
- Andersen, O., & Markham, K. (2006). Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. London: Taylor & Francis.
- Ankanna, S., Suhrulatha, D., & Savithramma, N. (2012). Chemotaxonomical studies of some important monocotyledons. *BRI*, 90-96.
- APG, IV. (2016). Distribución de la familia Moraceae. Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- Aswar, M., Urmila, A., Watkar, B., Vyas, M., Wagh, A., & Gujar, K. (2008). Anthelmintic activity of *Ficus benghalensis*. *Int. J. Green Pharm*, 170 - 172.
- Attia, M., Essa, E., Zaki, R., & Elkordy, A. (2020). An Overview of the Antioxidant Effects of Ascorbic Acid and Alpha Lipoic Acid (in Liposomal Forms) as Adjuvant in Cancer Treatment. *Antioxidants*, 1 - 15.
- Bartosz, G. (2003). Second face of oxygen. Free radicals in nature. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa [book in polish].

- Behera, B., Verma, N., Sonone, A., & Makhija, U. (2008). Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichenes. *Bioresour. Technol*, 776 - 784.
- Benzie, I., & Siu-Wai, C. (2014). Antioxidants in Food: Content, Measurement, Significance, Action, Cautions, Caveats, and Research Needs. *Adv Food Nutr Res.*, 1-53. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800270-4.00001-8>
- Berg, C., & Corner, E. (2005.). Flora Malesiana. Series I, Seed plants. , Part 2: Moraceae (*Ficus*). (Vol. Volumen 17). (C. C. Berg, E. J. Corner, & H. P. Nooteboom, Edits.) Leiden, Netherlands.
- Boligon, A., & Linde, M. (2014). Importance of HPLC in Analysis of Plants Extracts. *Austin Chromatography*, 1 - 2.
- Bonkanka, C. (2006). Evolucion farmacologica de terpenos y flavonoides de origen vegetal. Cajacanarias, España.
- Bravo, A.V & Acuña, W.D (2015). Evaluación fitoquímica y determinación de flavonoides en hojas de *Ficus benjamina* L. *Xilema* vol. 28, 61 - 67.
- Bristi, N. J., Alam, M., & Rafiquzzaman, M. (2013). “Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity”. *Saudi. Pharm. J*, 143-152.
- Bruun-Lund, S., Clement, W., Kjellberg, F., & Rønsted, N. (2017). First plastid phylogenomic study reveals potential cyto-nuclear discordance in the evolutionary history of *Ficus* L. (Moraceae). *Mol. Phylogenetics Evol*, 93 - 104. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.031>
- Calvi, S. (2013). Diversidad y distribucion de la familia moraceae en los bosques de la region madidi, la paz – bolivia. Tesis de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Ciencias Biológicas, Universidad mayor de san andres, facultad de ciencias puras y naturales, la paz. Disponible en: http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/Portal/0/Science%20and%20conservation/themadidiproject/publications/Calvi_2013_Thesis.pdf
- Cardona-Peña, V., Fuentes, A., & Cayola, L. (2005). Las Moraceae de la region de Madidi - Bolivia. *Ecología en Bolivia*, 212 - 264.
- Caritá, A., Fonseca-Santos, B., Shultz, J., Michniak-Kohn, B., Chorilli, M., & Leonardi, G. (2020). Vitamin C: One compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med*, 102-117.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1932/193215009001>.

- Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K., John, P., & Sharma, P. (2013). Vitamin C in disease prevention and cure: An overview. *Indian J. Clin. Biochem*, 314 - 328.
- Chantarasuwan, B., Berg, C., Kjellberg, F., Ronsted, N., García, M., Baider, C., & Van Welzen, P. (2015). A new classification of *Ficus* subsection *Urostigma* (Moraceae) based on four nuclear DNA markers (ITS, ETS, G3pdh and ncpGS), morphology and leaf anatomy. *Journal.pone.0128289*.
- Chen, X., Wu, X., Chai, W., Feng, H., Shi, Y., Zhou, H., & Chen, Q. (2013). Optimization of extraction of phenolics from leaves of *Ficus virens*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 903-915.
- Chen, Y., Xiao, H., Zheng, J., & Liang, G. (2015). Structure-thermodynamics-antioxidant activity relationships of selected natural phenolic acids and derivatives: An experimental and theoretical evaluation. *PLoS ONE*, 1-20.
- Chiang, Y. J. (2005). Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus micricarpa*. *Phytochemistry*, 495 - 501.
- Chiuman, L., & Sutanto, N. (2020). a healthier antioxidants-rich food with vitamin c and e. *IJGHR*, 111-116.
- Claustrat, B. (2020). Mélatonine : aspects biochimiques, physiologiques et pharmacologiques en relation avec les phénomènes rythmiques et le sommeil. *Medicine du sommeil*, 1-18. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msom.2019.12.187>
- Clement, W. L., & Weiblen, G. D. (2009). Morphological evolution in the mulberry family (Moraceae). *Syst. Bot.*, 530-552. doi:<https://doi.org/10.1600/036364409789271155>
- Clement, W., Buuun-Lund, S., Cohen, A., Kjellberg, F., Weiblen, G., & Rønsted, N. (2020). Evolution and classification of figs (*Ficus*, Moraceae) and their close relatives (Castilleae) united by involucre bracts. *Bot. J. Linn. Soc.*, 1–24. doi:<https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa022>
- Cook, J., & Rasplus, J.-Y. (2003). Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. *Trends Ecol. Evol.*, 241 - 248. doi:[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00062-4)
- Corrales, L., & Muñoz Ariza, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *NOVA.*, 10, 18.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*, 156–60. doi:<https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Costa, P., Lorenz-Lemke, A. P., Furnini, P. R., Honorio Coronado, E. N., Kjellberg, F., & Pereira, R. A. (2017). The phylogeography of two disjunct Neotropical *Ficus* (Moraceae) species

- reveals contrasted histories between the Amazon and the Atlantic Forests. *Botanical Bot. J. Linn. Soc.*, 272–289. doi:<https://doi.org/10.1093/botlinnean/box056>
- Cruaud, A., Ronsted, N., Chantarasuwan, B., Chou, L., Clement, W., Couloux, A., . . . Lopez-Vaamonde, C. Y. (2012). An Extreme Case of Plant–Insect Codiversification: Figs and Fig-Pollinating Wasps. *Syst. Biol.*, 1029–1047. doi:<https://doi.org/10.1093/sysbio/sys068>
- Cruaud, A., Ronsted, N., Chantarasuwan, B., Chou, L., Clement, W., Couloux, A., . . . Yodpintanee, A. (2012b). An extreme case of plant-insect codiversification: Figs and fig-pollinating wasps. *Syst. Biol.*, 1029 - 1047.
- Damu, A., Kuo, P., Shi, L., Li, C., Su, C., & Wu, T. (2009). Cytotoxic phenanthroindolizidine alkaloids from the roots of *Ficus septica*. *Planta Med.* 1152-1156.
- Datwyler, S., & Weiblen, G. (2004). On the origin of the Fig: Phylogenetic Relationships of Moraceae from ndhF Sequences. *Am. J. Bot.*, 91(5): 767 - 777.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. . *Biol. J. Linn. Soc.*, 407-415.
- De la Ossa, T. J. (2017). Estudio químico y evaluación de las actividades antioxidante y antibacteriana del extracto etanólico de la madera de oxandra longipetala (annonaceae),. Montería - Colombia: Universidad de Córdoba, facultad de ciencias básicas, departamento de química.
- Delgado Olivares, L., Betanzos Cabrera, G., & Sumaya Martínez, M. T. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo Investigación y Ciencia. Aguascalientes-México.
- El-Fishawy, A., Zayed, R., & Afifi, S. (2011). Phytochemical and pharmacological studies of *Ficus auriculata* Lour. *J. Nat. Prod.*, 184-195.
- Franco, M. (2010). *Soroceaxylon entrerriensis* gen. et n. sp. nov. (Moraceae) de la formación Ituzaingó (Plioceno-Pleistoceno), Cuenca del río Paraná, Argentina. *Rev Mex Cienc Geol*, 508 - 519.
- García, J. (2014). “Estudio químico, actividad antioxidante y bactericida de los extractos y subextractos de las hojas y corteza de Oxandra Xylopioides (Annonaceae)”. Montería .
- Garcia, K. (2015). Caracterización química de los flavonoides presentes en ficus citrifolia mill. reporte, universidad politécnica salesiana sede quito, ingeniería en biotecnología de los recursos naturales, Quito, Ecuador.
- García-Alvarado, K. (2015). Caracterización química de los flavonoides presentes en ficus citrifolia mill. tesis para obter el titulo de ingeniera en biotecnología de los recursos

naturales, universidad politécnica salesiana sede quito, ingeniería en biotecnología de los recursos naturales, Quito.

- Gentry, A. (1993). A field guide to the family and genera of woody plants of Northwest South America with supplementary notes on herbaceous taxa. Washington: Conservation International.
- ghodaro, O., & Akinloye, O. (2017). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med*, 1-7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Gill, S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 909-930.
- Ginting, C., Lister, I., Girsang, E., Riastawati, D., Kusuma, H., & Widowati, W. (2020). Antioxidant Activities of Ficus elastica Leaves Ethanol Extract and Its Compounds. *Mol Cell Biomed Sci.*, 27-33. doi:10.21705/mcbs.v4i1.86
- Giraldo, Q., Bernal, L., Robayo, M. A., Lobo, P., & Molano, G. L. (2015). Traditional use of medicinal plants in markets from Bogotá, D.C. *NOVA*, 73-80.
- Greenham, J. G. (2007). Intra- and interspecific variations in vacuolar flavonoids among Ficus species from the Budongo Forest, Uganda. *Biochem. Syst. Ecol*, 81- 90.
- Grison-Pige, L., Hossaert-McKey, M., Greef, J., & Jean-Marie, B. (2002). Fig volatile compounds—a first comparative study. *Phytochemistry*, 61–71. doi:[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00213-3)
- Gulcin, I. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch. Toxicol*, 1-65. doi:<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Gupta, N., & Jain, U. K. (2010). Prominent wound healing properties of indigenous medicines. *Journal of Natural Pharmaceuticals*, 2-13.
- Guzmán, M. (2014). Contribución Al Estudio Químico Y Bioprospección De Organismos Marinos Del Caribe Cordobés. Montería.
- Harrison, R. (2005). Figs and the Diversity of Tropical Rainforests. *BioScience*, 1053-1064. doi:[https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[1053:FATDOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[1053:FATDOT]2.0.CO;2)
- Hernandez, O., Zepeda, J., & Negron, A. (2015). Lecturas de Apoyo Para Comprender Mejor La Química. Ciudad de México.: 1st ed. (Muñoz V, ed.). Mexico, Distrito Federal.

- Herre, E., & Jander, K. (2008). Ecología evolutiva de los higos y sus asociados: avances recientes y acertijos sobresalientes. California: Machado California.
- Herre, E., Machado, C., Bermingham, E., Nason, J., Windsor, D., Mccafferty, S., . . . Bachman, K. (1996). Molecular phylogenies of figs and their pollinator wasps. *J. Biogeogr*, 521-530. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.1996.tb00014.x>
- Herrera, Z., & Moreno, Z. (2019). Caracterización química y actividad antihelmíntica del extracto metanólico de las hojas y del látex de ficus insípida willd frente ascaris lumbricoides. tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico, universidad interamericana , facultad de ciencias de la salud, carrera profesional de farmacia y bioquímica., Lima-Perú. Recuperado el 25 de Agosto de 2020, de <http://repositorio.unid.edu.pe/bitstream/handle/unid/48/12%20HERRERA%20HURTADO%20y%20MORENO%20FLORES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hidalgo, L., Sánchez, I., & Martínez S, I. M. (2018). Oxidative stress reference parameters standardization. *Rev. Cuba. de Medicina Mil*, 127-132.
- Honorio Coronado, E., Dexter, K., Poelchau, M., Hollingsworth, P., Phillips, O., & Pennington, R. (2014). *Ficus insipida* subsp. *insipida* (Moraceae) reveals the role of ecology in the phylogeography of widespread. *J. Biogeogr*, 1697–1709. doi:<https://doi.org/10.1111/jbi.12326>
- Hung, P., & Morita, N. (2008). Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities. *Food Chem*, 325–331. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.060>
- Ignat, I. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. . *Food Chem*, 126: 1821-1835.
- Imran, M., Rasool, N., Rizwan, K., Zubair, M., Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M., . . . ZE Jaafar, H. (2014). Chemical composition and Biological studies of *Ficus benjamina*. *Chem. Cent. J.*, 8 - 12. doi:[doi:10.1186/1752-153x-8-12](https://doi.org/10.1186/1752-153x-8-12)
- Ingle, K., Deshmukh, A., Padole, D., Dudhare, M., Moharil, M., & Khelurkar, V. (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 32-36.
- Ivanov, I., Dincheva, I., Badjakov, I., Petkova, N., Denev, P., & Pavlov, A. (2018). GC-MS analysis of unpolar fraction from *Ficus carica* L. (fig) leaves. *Int. Food Res*, 282-286.
- Jakubczyk, K., Kaldunska, J., Dec, K., Kawczuga, D., & Janda, K. (2020). Antioxidant properties of small-molecule non-enzymatic compounds. *Pol. Med. J*, 128–132. Obtenido de <http://medpress.com.pl/shop>

- Jeong, M., Kim, H., & Cha, J. (2009). Antimicrobial activity of methanol extract from *Ficus carica* leaves against oral bacteria. *J. Bacteriol. Res.*, 97-102.
- Jimenez, I., Speisky, C., & Noran, C. (2000). Radicales libres y antioxidantes en la prevención de enfermedades: II mecanismo de defensa antioxidantes. *ReuChilNutr*, 210-9.
- Johnson, F., & Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*, 340-352.
- Jousselin, E., Rasplus, J.-Y., & Kjellberg, F. (2003). Convergence and Coevolution in a mutualism: Evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. *Evolution*.
- Kanaujia, V., Irchhaiya, R., Yadav, R., Jaiswal, M., Bharti, J., Kailasiya, D., & Verma, M. (2012). In vitro and in vivo antioxidant activity on the leaves of *Ficus benjamina* linn. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 2029 - 2048.
- Khadangi, F., & Azzi, A. (2019). Vitamin E—The Next 100 Years. . *IUBMB life*, 411- 415.
- Khoddami, A., Wilkes, M., & Roberts, T. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 2328-2375. doi:10.3390/molecules18022328
- Kjellberg, F., Jousselin, E., Bronstein, J., Patel, A., Yokoyama, J., & Rasplus, J.-Y. (2001). Pollination mode in fig wasps: the predictive power of correlated traits. *Proc R Soc Lond B: Biological Sciences*, 1113 - 1121. doi:https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1633
- Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem. J*, 523–540.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev*, 118-126. doi:doi: 10.4103/0973-7847.70902
- López Sánchez, M. T. (2005). Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas. Gran Canaria, España.
- Lopez-Vaamonde, C., Wikstrom, N., Kjer, K., Weiblen, G., Rasplus, J., Machado, C., & Cook, J. (2009). Molecular dating and biogeography of fig-pollinating wasps. *Molec. Phyl. Evol.*, 715 - 727.
- Lotito, S., & Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon?. Vol. 41, no. 12.
- Machado da Costa, F., Klein, D. E., Philbrick, C. T., & Bove, C. P. (2018). Silica bodies in leaves of Neotropical Podostemaceae: Taxonomic and phylogenteic perspectives. *Ann. Bot.*, 122: 1187-1201.

- Maizatul, H., Mullen, W., & Crozier, A. (2011). Identification of Proanthocyanidin Dimers and Trimers, Flavone C-Glycosides, and Antioxidants in *Ficus deltoidea*, a Malaysian Herbal Tea. *J Agr Food Chem*, 1363–1369. doi:<https://doi.org/10.1021/jf1032729>
- Makhija, I., Sharma, I., & Khamar, D. (2010). Phytochemistry and Pharmacological properties of *Ficus religiosa*: an overview . *Ann. Biol. Res*, 171-180 .
- Mariajancyrani, J., Chandramohan, G., Brindha, P., & Saravanan, P. (2014). GC-MS Analysis of Terpenes from Hexane Extract of *Lantana camara* Leaves. *Int. J. Adv. Pharm., Biol. Chem.*, 37 - 41.
- Marquez, M. G. (2011). Capacidad antioxidante y caracterización estructural de las antocianinas de los frutos rojos de *Prunus domestica* L., *Ficus carica* L. y *Vitisvinifera* L. cv" red globe" cultivados en Perú.
- Martinez, A. (2005). Flavonoides. Medellin, Colombia. Obtenido de Flavonoides. Medellin, Colombia: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001>.
- Mbosso, E., Nguedia, J., Meyer, F., Lenta, B., Ngouela, S., Lallemand, B., Wintjens, R. (2012). Ceramide, cerebroside and triterpenoid saponin from the bark of aerial roots of *Ficus elastica* (Moraceae). *Phytochemistry*, 95–103.
- Misbah, H., Aziz, A., & Aminudin, N. (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of *Ficus deltoidea* fruit extracts and fractions. *BMC Complement Alternative Medicine*, 118. doi:<https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-118>
- Mittal, A., Sardana, S., & Pandey, A. (2013). Herbal boon for wounds. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 2.
- Mohamed Sharaf, N. S.-G.-A. (2000). Exudate Flavonoids from *Ficus altissima*. *Biochem. Syst. Ecol*, 291 - 293.
- Morley, R. (2000). Origin and evolution of tropical rain forests. Chichester, England.
- Murugan, R. A. (2012). Antioxidant, anti-inflammatory activity, and phytochemical constituents of ficus (*Ficus amplissima* Smith) . *bark. Food Sci Biotechnol*, 21, 59–67.
- Naidu, M., Sulochanamma, G., Sampathu, S., & Srinivas, P. (2008). Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chem*, 377–384. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.056>
- Nandi, A., Liang-Jun, Y., Jana, C., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 1 - 20. doi:<https://doi.org/10.1155/2019/9613090>

- Nawaz, H., Waheed, R., & Mubashir, N. (2020). Phytochemical Composition, Antioxidant Potential and Medicinal Significance of *Ficus*. Modern Fruit industry. doi:<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.86562>
- Novelli, S., Canuti, L., & Canini, A. (2014). Identification of alkaloid's profile in *Ficus benjamina* L. extracts with higher antioxidant power. *Am. J. Plant Sci*, 4029-4039. doi:<http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.526421>
- Nowakowska, J., Ciura, K., Kawczak, P., Wielgomas, B., & ęzek, T. (2018). Reversed-Phase and Normal-Phase Thin-Layer Chromatography and Their Application to the Lipophilicity Prediction of Synthetic Pyrethroids Based on Quantitative Structure–Retention Relationships. *Journal of Planar Chromatography*, 99 - 104. doi: 10.1556/1006.2018.31.2.1
- Nurviana, V., Tuslinah, L., & Susanti. (2020). Antioxidant Activity of Methanolic Extract of *Ficus elastica* Leaves. *Atlantis Press*, 53 - 56. doi: <https://doi.org/10.2991/ahsr.k.200523.015>
- Nworu, C., Nwuke, H., Akah, P., Okoye, F., & Esimone, C. . (2013). Extracts of *Ficus exasperata* leaf inhibit topical and systemic inflammation in rodents and suppress LPS-induced expression of mediators of inflammation in macrophages. *J. Immunotoxicol*, 302-310. doi:<https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.732121>
- Obiloma, A., Madu, W., & Osuji, G. (2018). Terpene profile of some selected medicinal plants (*Ficus capensis*, *Morinda lucida* and *Rauvolfia vomitoria*) in South-Eastern Nigeria. *IOSR J Pharm Biol Sci*, 92-96.
- Olaniran T. OLADIPO, B. A. (2017). Chemotaxonomic study of six Nigerian *Ficus* Species (Moraceae). *Not Sci Biol.* , 9 (2): 250 - 255.
- Papetti, A., Daglia, M., Aceti, C., Quaglia, C., & Gazzani, G. (2006). Isolation of an in vitro and ex vivo antiradical melanoidin from roasted barley. *J. Agric. Food Chem*, 1209 - 1216.
- Parveen, I., Wang, M., Zhao, J., Chittiboyina, A., Tabanca, N., Ali, A., Pan, Z. (2009). Investigating sesquiterpene biosynthesis in Ginkgo biloba: molecular cloning and functional characterization of (E,E)-farnesol and α -bisabolene synthases. *Plant Mol. Biol*, 451 - 462. doi:DOI 10.1007/s11103-015-0381-3
- Pawlak, K., Bylka, W., Jazurek, B., Matlawska, I., Sikorska, M., Manikowski, H., & Bialek-Bylka, G. (2010). Antioxidant activity of flavonoids of different polarity, assayed by modified abts cation radical decolorization and epr technique . *Acta Biol Crac Ser Bot*, 97–104.
- Pederneiras, L., Gaglioti, A., Romaniuc-Neto, S., & Mansano, V. d. (2018). The role of biogeographic barriers and bridges in determining divergent lieneages in *Ficus* (Moraceae). *Bot. J. Linnean Soc*, 594 - 613.

- Pederneiras, L., Romaniuc-Neto, S., & Mansano, V. d. (2015). Molecular Phylogenetics of *Ficus* Section Pharmacosycea and the Description of *Ficus* Subsection Carautaea (Moraceae). *Syst. Bot.*, 504-509. doi:<https://doi.org/10.1600/036364415X688826>
- Pelozo, R., Ferrucci, M., & Demattieis, M. (2005). Las especies de las familias Moraceae y Cecropiaceae del Parque Nacional Mburucuya. 25.
- Peng, H. Y. (2013). In memory of Wu Zheng-Yi (Wu Cheng-Yih) (1916-2013). *Plant Divers. Resour.*, 533-535.
- Peraza-Sánchez, S., Chai, H., & Shin, Y. (2002). Constitutens of the leaves and twigs of *Ficus hispida*. *Planta. Med.*, 186 - 188.
- Petrucelli, R., Ieri, F., Ciaccheri, L., & Bonett, A. (2018). Polyphenolic profiling and chemometric analysis of leaves from Italian *Ficus carica* L. varieties. Polyphenol compounds in common fig. *Eur. J. Hortic. Sci.*, 94-103. doi:<https://doi.org/10.17660/eJHS.2018/83.2.5>
- Pistelli, L., & Giorgi, I. (2012). Antimicrobial Properties of Flavonoids. *Dietary Phytochemicals and Microbes*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3926-0_2
- Portilla Salinas, J. A. (2009). Laboratorio Química. Disponible en: <http://www.prof.uniandes.edu.co/~infquimi/programaspdf/BLabQO-I.pdf>.
- Poumale, H., Kengapa, R., Tchouankeu, J., Keumedjio, F., Laatsch, H., & Ngadju, B. (2008). Pentacyclic Triterpenes and Other Constituents from *Ficus cordata* (Moraceae). *Zeitschrift für Naturforschung*, 1335 – 1338. doi:<https://doi.org/10.1515/znb-2008-1113>
- Qing-Wen, Z., Li-Gen, L., & Wen-Cai, Y. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13:20. doi:<https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Quintanar, M., & Calderón, J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica.*, 28(3): 89-101.
- Quiroz-Lobo, Y. (2019). Estudio químico y análisis de las actividades antioxidante, antibacteriana y antifúngica en invertebrados marinos recolectados en la bahía de Cispata. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de magister en ciencias químicas. , Universidad de Córdoba, Química., Montería.
- Rajiv, P., & Sivaraj, R. (2012). Screening for phytochemicals and antimicrobial activity of aqueous extract of *Ficus religiosa* Linn. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 207-209.
- Ralston, L., Subramanian, S., Matsuno, M., & Yu, O. (2005). Partial Reconstruction of Flavonoid and Isoflavonoid Biosynthesis in Yeast Using Soybean Type I and Type II Chalcone Isomerases. *Plant Physiol.*, 1375–1388. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.104.054502>

- Ramawat, K. (2019). Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/337153441>. doi:DOI: 10.1007/978-3-030-30746-2_1
- Ramírez, D., & López, R. (2010). *Familia Moraceae*. Proyecto curricular-Ingeniería Forestal., Universidad distrital Francisco José de Caldas., Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Bogotá. Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/69184012/familia-moraceae>
- Rangel-Ch, J. (2012). Colombia Biodiversa XII, La región Caribe de Colombia. Bogotá: J.O.
- Rasool, R., Ganai, B., Akbar, S., Kamili, A., & Masood, A. (2010). Phytochemical screening of *Prunella vulgaris* L. - an important medicinal plant of Kashmir. *Pak J Pharm Sci.*, 399-402.
- Rasplus, J.-Y., Rodriguez, L., Sauné, L., Peng, Y.-Q., Bain, A., Kjellberg, F., . . . Cruaud, A. (2020). Exploring systematic biases, rooting methods and morphological evidence to unravel the evolutionary history of the genus *Ficus* (Moraceae). *bioRxiv*, 1 - 50. doi:<https://doi.org/10.1101/2020.04.15.042259>
- Ravaglia, D., Espley, R., Henry-Kirk, R., Andreotti, C., Ziosi, V., Hellens, R., . . . Allan, A. (2013). Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors. *BMC Plant Biology*, 13:68. Obtenido de <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/13/68>
- Rehana, B., & Nagarajan, N. (2014). TLC and HPTLC fingerprinting of leaf extracts of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merrill. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 29-33.
- Reichardt, C., & Welton, T. (2011). Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry. Disponible en.: https://books.google.com.co/books/about/Solvents_and_Solvent_Effects_in_Organic.html?hl=es&id=6MzGgfWZAIMC.
- Rønsted, N., Salvo, G., & Savolainen, V. (2007). Biogeographical and phylogenetic origins of African fig species (*Ficus* section Galoglychia). *Mol. Phylogenetics Evol*, 190–201. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.12.010>
- Rønsted, N., Weiblen, G., Clement, W., Zerega, N., & Savolainen, V. (2008.). Reconstructing the phylogeny of figs (*Ficus*, Moraceae) to reveal the history of the fig pollination mutualism. *Symbiosis*, 45–56.
- Rønsted, N., Weiblen, G., Cook, J., Salamin, N., Machado, C., & Savolainen, V. (2005). 60 million years of co-divergence in the fig-wasp symbiosis. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 593–2599. doi:<https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3249>
- Salvi, V., Joshi, Y., Dhande, S., & Kadam, V. (2013). A Review on *Ficus hispida*. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 149-154.

- Saptarini, N., & Herawati, I. (2015). Comparative Antioxidant Activity on the *Ficus benjamina* and *Annona reticulata* Leaves . *Int. J. Public Health*, 21-26.
- Sarg, T., Abbas, F., El-Sayed, Z., & Mustafa, A. (2011). Two new polyphenolic compounds from *Ficus retusa* L."variegata" and the biological activity of the different plant extracts. *J. Pharmacognosy Phytother*, 89-100. doi:<https://doi.org/10.5897/JPP.9000053>
- Schantz, M. (2006). Pressurized liquid extraction in environmental analysis. *Anal Bioanal Chem*, 1043–1047. doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-006-0648-2>
- Shahidi, F. &. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J. Funct. Foods*, 18, 820-897.
- Singh, R. (2016). Chemotaxonomy: A Tool for Plant Classification. *Med. Plants Stud*, 90-93.
- Singh, R., & Geetanjali. (2018). Chemotaxonomy of Medicinal Plants: Possibilities and Limitations. *Natural Products and Drug Discovery*, 119-136. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102081-4.00006-X>
- Singh. (2010). An Introduction to Biodiversity. Ane Books Pvt, Ltd.
- Sirisha, N., Sreenivasulu, M., Sangeeta, K., & Chetty, C. (2010). Antioxidant Properties of *Ficus* Species – A Review. *Int J Pharmtech Res*, 2174-2182.
- Špánik, I., & Machyňáková, A. (2017). Recent Applications of GC with high-resolution MS. *J. Sep. Sci*, 1 - 51.
- Spiegel, M., Kapusta, K., Kołodziejczyk, W., Saloni, J., bikowska, B., Hill, G., & Sroka, Z. (2020). Antioxidant Activity of Selected Phenolic Acids—Ferric Reducing Antioxidant Power Assay and QSAR Analysis of the Structural Features. *Molecules*, 1 - 15.
- Sytsma, K., Morawetz, J., Pires, J., Nepokroeff, M., Conti, E., Zjhra, M., Chase, M. (2002). Urticalean rosids: circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on rbcL, trnL-F, and ndhF sequences. *Am. J. Bot.*, 1531–1546.
- Taviano, M., Rashed, K., Filocamo, A., Cacciola, F., Dugo, P., Mondello, L., Miceli, M. (2018). Phenolic profile and biological properties of the leaves of *Ficus vasta* Forssk. (Moraceae) growing in Egypt. *BMC Complement Altern Med*, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1186/s12906-018-2210-0>
- Teixeira, D., Patao~, R., Coelho, A., & Teixeira da Costa, C. (2006). Comparison between sample disruption methods and solid–liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *J. Chromatogr. A*, 22–28. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.047>

- Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Chapter 16 - Classification of Phenolic Compounds in Plants. *Polyphenols in Plants*, 263-284. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00026-8>
- Umoh, O. (2020). Chemotaxonomy: The Role of Phytochemicals in Chemotaxonomic Delineation of Taxa. *Asian J. Plant Sci*, 43-52. doi:10.9734/APRJ/2020/v5i130100
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *J. Int J Biochem Cell Biol*, 44 – 84. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Van Noort, S. & Rasplus, J.Y. (2020). Figweb: figs and fig wasps of the world. URL: www.figweb.org(Accessed on <06-11-2020>).
- Varas, D. (2004). Análisis de flavonoides en plantas medicinales del Sur de Chile con técnica HPLC. Valdivia, Chile.
- Vaya, J., & Mahmood, S. (2006). Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *BioFactors (Oxford, England)*, 169-75.
- Veberic, R., Colaric, M., & Stampar, F. (2008). Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. *Food. Chem*, 153–157. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.061>
- Vejarano, J., & Guerrero, V. T. (2011). Fraccionamiento Fitoquímico del Contenido de Metabolitos Secundarios en Hojas de la Planta Medicinal “OJE” (*Ficus insípida*). Reporte, Universidad Nacional Agraria de la Selva., Tingo María, Perú. Obtenido de <https://studylib.es/doc/137549/oje--ficus-insipida---universidad-nacional-agraria-de-...>
- Vermerris, R. &. (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer. West Lafayette.
- Wang, Y., Liang, H., Zhang, Q., Cheng, W., & Yi, S. (2014). Phytochemical and chemotaxonomic study on *Ficus tsiangii* Merr. ex Corner. *Biochem. Syst. Ecol*, 210 - 215.
- Weiblen, W. C. (2009). Evolucion morfológica de la familia de la mora (Moraceae). *Botanica sistemática*, 530 - 552.
- Weiblen., G. D. (2000). Phylogenetic Relationships of Functionally Dioecious *Ficus* (Moraceae) Based on Ribosomal DNA Sequences and Morphology. *Am. J. Bot*, 1342-1357. doi:<https://doi.org/10.2307/2656726>
- Wuerges, J., Jin-Won, L., Yang-In, Y., Hyung-Soon, Y., & Sa-Ouk, K. (2004). Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 8569–8574.

- Xiang-Qin, Y., Chun-Lei, X., & Peng, H. (2018). Taxonomy in the Kunming Institute of Botany (KIB): Progress during the past decade (2008e2018) and perspectives on future development. *Plant Diversity.*, 1-11.
- Xin-Yu, J., Yong-Mei, W., Jing-Ya, L., Chun, L., & Ai-Jun, H. (2020). Alkaloid Constituents of *Ficus hispida* and Their Antiinflammatory Activity. *Nat. Products Bioprospect*, 45–49. doi:<https://doi.org/10.1007/s13659-020-00233-5>
- Xu, L., Rhett, D., Harrison, Yang, P., & Yang, D.-R. (2011). New insight into the phylogenetic and biogeographic history of genus *Ficus* : Vicariance played a relatively minor role compared with ecological opportunity and dispersal. *J Syst Evol*, 546 - 557. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2011.00155.x>
- Xu, S., Schluter, & Schiestl, F. (2012). Pollinator-driven speciation in sexually deceptive orchids. *Internet. J. Ecol.*
- Yapa, V., Qazzaz, M., Raja, V., Bradshaw, T., Hwei-San, L., Kae-Shin, S., . . . Kuan-Hon, L. (2016). Fistulopsines A and B antiproliferative septicine-type alkaloids from *Ficus fistulosa*. *Phytochem. Lett*, 136 - 141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2015.12.007>
- Yi, L., Jin, X., Chun-Ye, C., Yu-Jie, F., Zhang, T., Chang, H., . . . Man-Tian, M. (26 de Agosto de 2011). Chemical Structures of 4-Oxo-Flavonoids in Relation to Inhibition of Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL)-Induced Vascular Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci*, 5471-5489. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms12095471>
- Yi, T., Chen, Q., He, X., So, S., Lo, Y., Fan, L., Chen, H. (2013). Chemical quantification and antioxidant assay of four active components in *Ficus hirta* root using UPLC-PAD-MS fingerprinting combined with cluster analysis. *Chem. Cent. J*, 1-9.
- Yi-Ming, C., & Yueh-Hsiung, K. (2002). Novel Triterpenoids from the Aerial Roots of *Ficus microcarpa*. *J. Org. Chem.*, 7656 - 7661. doi:<https://doi.org/10.1021/jo020262e>
- Yi-Ming, Jang-Yan, Ching-Chuan, Chi-Yen, & Yueh-Hsiung. (2005). Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry*, 495–501. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.12.026>
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., & Billups, K. (2001). Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. *SCIENCE*, 686-693. doi:DOI: 10.1126/science.1059412
- Zelko, I., Mariani, T., & Folz, R. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the cuzn-sod (sod1), mn-sod (sod2), and ec-sod (sod3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 337–349. doi:[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00905-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00905-X)

- Zhang, Q., Onstein, R., Little, S., & Sauquet, H. (2018). Estimating divergence times and ancestral breeding systems in *Ficus* and Moraceae. *Ann. Bot.*, 1–14. doi:<https://doi.org/10.1093/aob/mcy159>
- Zhang, S. Y. (2011). Multi-gene analysis provides a well-supported phylogeny of Rosales. *Mol. Phylogenetics Evol.*, 21 - 28. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.04.008>
- Zheng-Feng, S., Chun, L., Bang-Wei, Y., He-Yao, W., & Ai-Jun, H. (2016). New Alkaloids and a-Glucosidase Inhibitory Flavonoids from *Ficus hispida*. *Chem. Biodiversity*, 445 - 450. doi:<https://doi.org/10.1002/cbdv.201500142>

2.9. ANEXOS

ANEXO 1.1. Clasificación taxonómica de las especies de estudio.

- Clasificación taxonómica de *Ficus benjamina* L.

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Rosanae Takht.
Orden	Rosales Bercht. & J. Presl
Familia	Moraceae Gaudich.
Género	<i>Ficus</i> L.
Especie	<i>Ficus benjamina</i> L.

- Clasificación taxonómica de *Ficus insipida* Willd.

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Rosanae Takht.
Orden	Rosales Bercht. & J. Presl
Familia	Moraceae Gaudich.
Género	<i>Ficus</i> L.
Especie	<i>Ficus insipida</i> Willd.

- Clasificación taxonómica de *Ficus elástica* Roxb. ex Hornem.


Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Rosanae Takht.
Orden	Rosales Bercht. & J. Presl
Familia	Moraceae Gaudich.
Género	<i>Ficus</i> L.
Especie	<i>Ficus elastica</i> Roxb. ex Hornem.

- Clasificación taxonómica de *Ficus bullenei* I.M. Johnst.


Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Rosanae Takht.
Orden	Rosales Bercht. & J. Presl
Familia	Moraceae Gaudich.
Género	<i>Ficus</i> L.
Especie	<i>Ficus bullenei</i> I.M. Johnst.

ANEXO 1.2. Etiquetas de registro herbario Universidad de Córdoba (HUC)


- Etiqueta de registro de la especie *Ficus insipida* Willd.

	UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA FLORA COLOMBIANA	HERBARIO HUC
<i>Ficus insipida</i> Willd. “Higuera, Ojé”		MORACEAE
Árbol de 8 metros aprox, con CAP de 80 cm, hojas lustrosas, presencia de látex blanco, fruto sicono.		
Córdoba. Planeta Rica. Finca Abastecedora. N 8° 23'54.46". O 75° 34'14.09" 83 m alt.		
H. Furnieles Núñez 001 Det: H. Furnieles., 30/ Abril/2019		14 Abril 2019
ESTUDIO QUIMIOTAXONÓMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO <i>Ficus</i> L. (Moraceae), PLANETA RICA (CÓRDOBA-COLOMBIA).		


- Etiqueta de registro de la especie *Ficus elastica* Roxb. ex Hornem.

	UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA FLORA COLOMBIANA	HERBARIO HUC
	<p><i>Ficus elastica</i> Roxb. ex Hornem. MORACEAE</p> <p>“Caucho sabanero”</p> <p>Árbol de 12 metros aprox, con CAP de 140 cm, hojas lustrosas, presencia de látex blanco.</p> <p>Córdoba. Planeta Rica. N 8° 24' 55.63". O 75° 34' 44.66" 74 m alt.</p> <p>H. Furnieles Núñez 002 14 Abril 2019 Det: H. Furnieles., 30/ Abril/2019</p> <p>ESTUDIO QUIMIOTAXONÓMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO <i>Ficus</i> L. (Moraceae), PLANETA RICA (CÓRDOBA-COLOMBIA).</p>	

- Etiqueta de registro de la especie *Ficus benjamina* L.

	UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA FLORA COLOMBIANA	HERBARIO HUC
	<p><i>Ficus benjamina</i> L. MORACEAE</p> <p>“Laurel”</p> <p>Árbol de 10 metros aprox, con CAP de 112 cm, hojas lustrosas, presencia de látex blanco</p> <p>Córdoba. Planeta Rica. Finca el Oriente. N 8° 23' 09.57". O 75° 33' 42.54" 79 m alt</p> <p>H. Furnieles Núñez 003 14 Abril 2019 Det: H. Furnieles., 30/ Abril/2019</p> <p>ESTUDIO QUIMIOTAXONÓMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO <i>Ficus</i> L. (Moraceae), PLANETA RICA (CÓRDOBA-COLOMBIA).</p>	

- Etiqueta de registro de la especie *Ficus bullenei* I.M. Johnst.

	UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA FLORA COLOMBIANA	HERBARIO HUC
<i>Ficus bullenei</i> I.M. Johnst. “Higo”		MORACEAE
<p>Árbol de 12 metros aprox, con CAP de 120 cm, hojas coriáceas, lustrosas, presencia de látex blanco que se oxida a una tonalidad rojiza, presencia de pubescencia, fruto sicono.</p> <p>Córdoba. Planeta Rica. Finca Abastecedora. N 8° 24'18.52". O 75° 34'38.73" 85 m alt.</p> <p>H. Furnieles Núñez 004 14 Abril 2019 Det: H. Furnieles., 30/ Abril/2019</p> <p>ESTUDIO QUIMIOTAXONÓMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS ETANÓLICOS FOLIARES DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO <i>Ficus</i> L. (Moraceae), PLANETA RICA (CÓRDOBA-COLOMBIA).</p>		

ANEXO 2.1. Datos de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos foliares evaluados por el método DPPH.

- Datos de la actividad antioxidante del extracto etanólico foliar de *Ficus benjamina*

Concentración	Prom Abs, <i>F. benjamina</i> . DPPH.	%Inhibición, <i>F. benjamina</i> . DPPH.
1 mg/L	0,250	7 %
2 mg/L	0,227	15 %
3 mg/L	0,202	24 %
4 mg/L	0,169	37 %
5 mg/L	0,144	46 %

- Datos de la actividad antioxidante del extracto etanólico foliar de *Ficus insipida*.

Concentraciones	Prom Abs, <i>F. insipida</i> . DPPH.	%Inhibición, <i>F. insipida</i> . DPPH.
1 mg/L	0,246	7 %
2 mg/L	0,216	18 %
3 mg/L	0,191	28 %
4 mg/L	0,162	39 %
5 mg/L	0,124	54 %

- Datos de la actividad antioxidante del extracto etanólico foliar de *Ficus elastica*.

Concentraciones	Prom Abs, <i>F. elastica</i> . DPPH.	%Inhibición, <i>F. elastica</i> . DPPH.
1 mg/L	0,220	16 %
2 mg/L	0,147	45 %
3 mg/L	0,086	69 %
4 mg/L	0,060	81 %
5 mg/L	0,039	90 %

- Datos de la actividad antioxidante del extracto etanólico foliar de *Ficus bullenei*.

Concentraciones	Prom Abs, <i>F. bullenei</i> . DPPH.	%Inhibición, <i>F. bullenei</i> . DPPH.
1 mg/L	0,257	13 %
2 mg/L	0,215	27 %
3 mg/L	0,187	37 %
4 mg/L	0,166	44 %
5 mg/L	0,095	68 %

ANEXO 2.2. Datos de la actividad antioxidante de los extractos etanólicos foliares evaluados por el método ABTS⁺⁺.

- Datos de la actividad antioxidante del extracto etanólico foliar de *Ficus benjamina*.

Concentraciones	Prom Abs, <i>F. benjamina</i> . ABTS ⁺⁺	%Inhibición, <i>F. benjamina</i> . ABTS ⁺⁺
1 mg/L	0,486	7,7 %
1,5 mg/L	0,405	10,3 %
2 mg/L	0,349	22,7 %
2,5 mg/L	0,282	37,6 %
3 mg/L	0,616	54,7 %

- Datos de la actividad antioxidante del extracto etanólico foliar de *Ficus insipida*.

Concentraciones	Prom Abs, <i>F. insipida</i> . ABTS ⁺⁺	%Inhibición, <i>F. insipida</i> . ABTS ⁺⁺
1 mg/L	0,508	1 %
1,5 mg/L	0,437	15 %
2 mg/L	0,370	28 %
2,5 mg/L	0,308	40 %
3 mg/L	0,243	53 %

- Datos de la actividad antioxidante del extracto etanólico foliar de *Ficus elastica*.

Concentraciones	Prom Abs, <i>F. elastica</i> . ABTS ⁺⁺	% Inhibición, <i>F. elastica</i> . ABTS ⁺⁺
2 mg/L	0,426	17 %
3 mg/L	0,310	40 %
4 mg/L	0,235	55 %
5 mg/L	0,130	75 %
6 mg/L	0,077	86 %

- Datos de la actividad antioxidante del extracto etanólico foliar de *Ficus bullenei*.

Concentraciones	Prom Abs, <i>F. bullenei</i> . ABTS ⁺⁺	% Inhibición, <i>F. bullenei</i> . ABTS ⁺⁺
2 mg/L	0,395	25 %
3 mg/L	0,262	51 %
4 mg/L	0,139	74 %
5 mg/L	0,057	90 %
6 mg/L	0,020	97 %

ANEXO 2.3. Resultados de los análisis de varianza ANOVA de un factor para el método DPPH.

- Tabla ANOVA para Absorbancias vs Concentraciones *F. benjamina*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0216687	4	0.00541717	180.17	0.0000
Intra grupos	0.000300667	10	0.0000300667		
Total (Corr.)	0.0219693	14			

- Tabla ANOVA para Absorbancias vs Concentraciones *F. insipida*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0247993	4	0.00619983	19.01	0.0001
Intra grupos	0.003262	10	0.0003262		
Total (Corr.)	0.0280613	14			

- Tabla ANOVA para Absorbancias vs Concentraciones *F. elastica*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0647497	4	0.0161874	157.36	0.0000
Intra grupos	0.00102867	10	0.000102867		
Total (Corr.)	0.0657784	14			

- Tabla ANOVA para Absorbancias vs Concentraciones *F. bullenei*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0438949	4	0.0109737	27.54	0.0000
Intra grupos	0.003984	10	0.0003984		
Total (Corr.)	0.0478789	14			

ANEXO 2.4. Resultados de los análisis de varianza ANOVA de un factor para el método ABTS⁺.

- Tabla ANOVA para Absorbancias vs Concentraciones *F. benjamina*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.141062	4	0.0352656	256.91	0.0000
Intra grupos	0.00137267	10	0.000137267		
Total (Corr.)	0.142435	14			

- Tabla ANOVA para Absorbancias vs Concentraciones *F. insipida*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.130608	4	0.0326521	236.72	0.0000
Intra grupos	0.00137933	10	0.000137933		
Total (Corr.)	0.131988	14			

- Tabla ANOVA para Absorbancias vs Concentraciones *F. elastica*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.234342	4	0.0585856	199.95	0.0000
Intra grupos	0.00293	10	0.000293		
Total (Corr.)	0.237272	14			

- Tabla ANOVA para Absorbancias vs Concentraciones *F. bullenei*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.285878	4	0.0714696	285.35	0.0000
Intra grupos	0.00250467	10	0.000250467		
Total (Corr.)	0.288383	14			

ANEXO 2.5. Resultados del análisis de las pruebas de múltiples rangos para el ensayo DPPH.

- Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancias vs Concentraciones *F. benjamina*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	0.144667	X
4	3	0.169667	X
3	3	0.201667	X
2	3	0.227333	X
1	3	0.25	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	0.0226667	0.00997563
1 - 3	*	0.0483333	0.00997563
1 - 4	*	0.0803333	0.00997563
1 - 5	*	0.105333	0.00997563
2 - 3	*	0.0256667	0.00997563
2 - 4	*	0.0576667	0.00997563
2 - 5	*	0.0826667	0.00997563
3 - 4	*	0.032	0.00997563
3 - 5	*	0.057	0.00997563
4 - 5	*	0.025	0.00997563

- Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancias vs Concentraciones *F. insipida*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	0.124	X
4	3	0.162	X
3	3	0.191333	XX
2	3	0.199667	X
1	3	0.246333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	0.0466667	0.0328579
1 - 3	*	0.055	0.0328579
1 - 4	*	0.0843333	0.0328579
1 - 5	*	0.122333	0.0328579
2 - 3		0.00833333	0.0328579
2 - 4	*	0.0376667	0.0328579
2 - 5	*	0.0756667	0.0328579
3 - 4		0.0293333	0.0328579
3 - 5	*	0.0673333	0.0328579
4 - 5	*	0.038	0.0328579

- Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancias vs Concentraciones *F. elastica*.

Método: 95.0 porcentaje LSD.

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	0.039	X
4	3	0.0606667	X
3	3	0.0866667	X
2	3	0.147333	X
1	3	0.220333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	0.073	0.0184516
1 - 3	*	0.133667	0.0184516
1 - 4	*	0.159667	0.0184516
1 - 5	*	0.181333	0.0184516
2 - 3	*	0.0606667	0.0184516
2 - 4	*	0.0866667	0.0184516
2 - 5	*	0.108333	0.0184516
3 - 4	*	0.026	0.0184516
3 - 5	*	0.0476667	0.0184516
4 - 5	*	0.0216667	0.0184516

- Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancias vs Concentraciones *F. bullenei*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
5	3	0.095	X
4	3	0.166333	X
3	3	0.187333	XX
2	3	0.215	X
1	3	0.257667	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	0.0426667	0.0363126
1 - 3	*	0.0703333	0.0363126
1 - 4	*	0.0913333	0.0363126
1 - 5	*	0.162667	0.0363126
2 - 3		0.0276667	0.0363126
2 - 4	*	0.0486667	0.0363126
2 - 5	*	0.12	0.0363126
3 - 4		0.021	0.0363126
3 - 5	*	0.0923333	0.0363126
4 - 5	*	0.0713333	0.0363126

ANEXO 2.6. Resultados del análisis de las pruebas de múltiples rangos para el ensayo ABTS⁺.

- Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancias vs Concentraciones *F. benjamina*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
3	3	0.205333	X
2.5	3	0.282667	X
2	3	0.349	X
1.5	3	0.405333	X
1	3	0.486333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 1.5	*	0.081	0.0213147
1 - 2	*	0.137333	0.0213147
1 - 2.5	*	0.203667	0.0213147
1 - 3	*	0.281	0.0213147
1.5 - 2	*	0.0563333	0.0213147
1.5 - 2.5	*	0.122667	0.0213147
1.5 - 3	*	0.2	0.0213147
2 - 2.5	*	0.0663333	0.0213147
2 - 3	*	0.143667	0.0213147
2.5 - 3	*	0.0773333	0.0213147

- Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancias vs Concentraciones *F. insipida*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
3	3	0.243	X
2.5	3	0.308	X
2	3	0.370667	X
1.5	3	0.437667	X
1	3	0.508	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 1.5	*	0.0703333	0.0213664
1 - 2	*	0.137333	0.0213664
1 - 2.5	*	0.2	0.0213664
1 - 3	*	0.265	0.0213664
1.5 - 2	*	0.067	0.0213664
1.5 - 2.5	*	0.129667	0.0213664
1.5 - 3	*	0.194667	0.0213664
2 - 2.5	*	0.0626667	0.0213664
2 - 3	*	0.127667	0.0213664
2.5 - 3	*	0.065	0.0213664

- Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancias vs Concentraciones *F. elastica*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	0.0773333	X
5	3	0.13	X
4	3	0.235333	X
3	3	0.31	X
2	3	0.426333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2 - 3	*	0.116333	0.0311409
2 - 4	*	0.191	0.0311409
2 - 5	*	0.296333	0.0311409
2 - 6	*	0.349	0.0311409
3 - 4	*	0.0746667	0.0311409
3 - 5	*	0.18	0.0311409
3 - 6	*	0.232667	0.0311409
4 - 5	*	0.105333	0.0311409
4 - 6	*	0.158	0.0311409
5 - 6	*	0.0526667	0.0311409

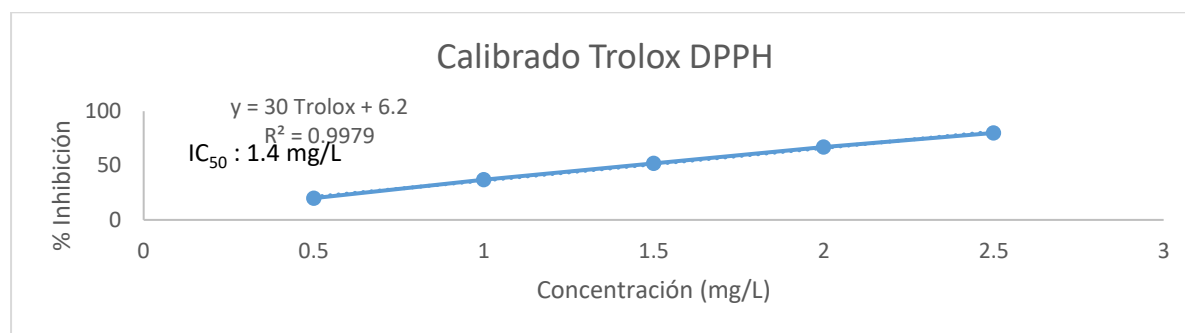
- Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancias vs Concentraciones *F. bullenei*.

Método: 95.0 porcentaje LSD

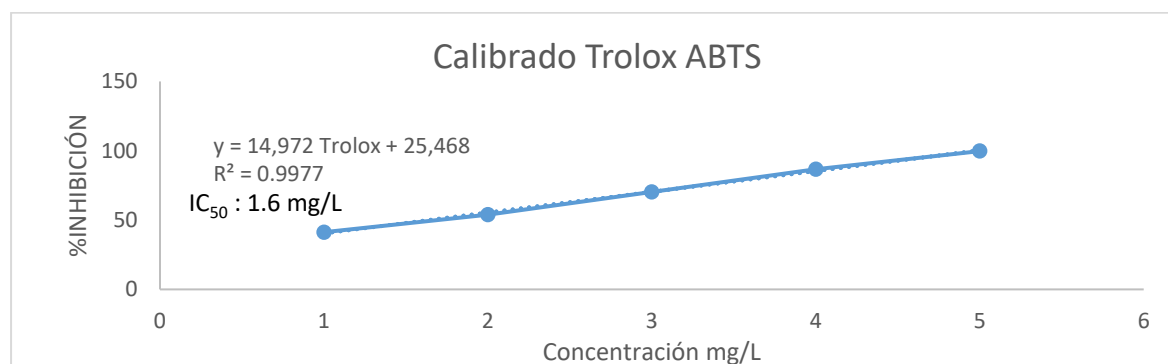
Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
6	3	0.02	X
5	3	0.0573333	X
4	3	0.139667	X
3	3	0.262333	X
2	3	0.395333	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2 - 3	*	0.133	0.0287921
2 - 4	*	0.255667	0.0287921
2 - 5	*	0.338	0.0287921
2 - 6	*	0.375333	0.0287921
3 - 4	*	0.122667	0.0287921
3 - 5	*	0.205	0.0287921
3 - 6	*	0.242333	0.0287921
4 - 5	*	0.0823333	0.0287921
4 - 6	*	0.119667	0.0287921
5 - 6	*	0.0373333	0.0287921

ANEXO 2.7. Graficas de calibrados TROLOX para los ensayos de actividad antioxidante DPPH. y ABTS⁺.



Grafica del calibrado TROLOX para el ensayo DPPH.



Grafica del calibrado TROLOX para el ensayo ABTS⁺.

ANEXO 2.8. Resultados del análisis de las pruebas de múltiples rangos para el ensayo FRAP, (análisis de comparación de varias muestras).

Pruebas de Múltiple Rangos.

Método: 95.0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Abs F.bull	15	0.946133	X
Abs F.benja	15	0.9838	X
Abs F.insip	15	1.02893	X
Abs F.elast	15	1.05227	X
Abs A.Gálico	15	1.82333	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Abs A.Gálico - Abs F.benja	*	0.839533	0.109702
Abs A.Gálico - Abs F.insip	*	0.7944	0.109702
Abs A.Gálico - Abs F.elast	*	0.771067	0.109702
Abs A.Gálico - Abs F.bull	*	0.8772	0.109702
Abs F.benja - Abs F.insip		-0.0451333	0.109702
Abs F.benja - Abs F.elast		-0.0684667	0.109702
Abs F.benja - Abs F.bull		0.0376667	0.109702
Abs F.insip - Abs F.elast		-0.0233333	0.109702
Abs F.insip - Abs F.bull		0.0828	0.109702
Abs F.elast - Abs F.bull		0.106133	0.109702